n° d'enregistrement
au C.N.R.S. AO 1598

ARTICLE PRINCIPAL

Recouvrant en partie

LA THESE DE DOCTORAT ES SCIENCES NATURELLES

présentée

A LA FACULTE DES SCIENCES

de PARIS

par

Monsieur Bernard DROZ

pour obtenir

le grade de Docteur Es-Sciences

Sujet de la Thèse : Synthèse et transfert des protéines cellulaires dans les neurones ganglionnaires

soutenue le 30 juin 1967, devant la Commission d'Examen

MM. R. COUTEAUX Président
F. MOREL Examinateurs
F. CHAPEVILLE

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534910_0028

SYNTHÈSE ET TRANSFERT DES PROTÉINES CELLULAIRES DANS LES NEURONES GANGLIONNAIRES ÉTUDE RADIOAUTOGRAPHIQUE QUANTITATIVE EN MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE

Bernard DROZ
Département de Biologie, Centre d'Etudes Nucléaires, Saclay

JOURNAL DE MICROSCOPIE — Vol. 6, n° 2 - *1967* - pp. 201 à 228

JOURNAL DE MICROSCOPIE

Le « Journal de Microscopie », créé en 1962, est publié par les soins de la Société Française de Microscopie électronique avec le concours du Centre National de la Recherche Scientifique.

Le « Journal de Microscopie » paraît tous les deux mois soit six numéros par an) et publie des articles originaux portant sur la microscopie et ses applications microscopie classique, électronique, ionique, X, etc...; applications à la cristallographie, à la biologie, à la métallographie, etc...). Le journal accepte des articles en *anglais* et en *allemand*.

Conseil scientifique international :

B. Afzelius, Stockholm
T.F. Anderson, Philadelphie
A. Bairati, Milan
P. Bartl, Prague
E.L. Benedetti, Amsterdam
A. Birch-Andersen, Copenhague
M. Burgos, Mendoza
A. Claude, Bruxelle
V.E. Cosslett, Cambridge
F. Guba, Budapest
E. Kellenberger, Genève
J.B. Le Poole, Delft
E.H. Mercer, Canberra
E. Ruska, Berlin
R.. Uyeda, Nagoya

Comité de rédaction :

J. André
R. Bernard
W. Bernhard
M. Bessis
R. Buvat
N. Carasso
R. Castaing
R. Couteaux
G. Dupouy
E. Fauré-Fremiet
C. Fert
S. Goldsztaub
P. Grivet
A. Guinier
F. Haguenau
P. Lépine
C. Magnan
A. Oberlin
P. Pério
F. Perrier
J. Philibert
D. Picard
A. Policard
A. Saulnier
J.P. Thiéry

Le secrétariat de rédaction est assuré par A. Oberlin et J. Philibert, la rédaction en chef par P. Favard.

ABONNEMENT

	1962, 1963 1964, 1965 (par volume)	1966	1967
Laboratoires et Firmes ..	100, - F 21, - US $	140, - F 30, - US $	200, - F 42, - US $
Particuliers, *à titre strictement privé*	80, - F 17, - US $	100, - F 21, - US $	140, - F 30, - US $
Membres de la S.F.M.E., *à titre strictement privé*	50, - F 10,50 US $	65, - F 14, - US $	80, - F 17, - US $
Numéro séparé	20, - F 4,50 US $	30, - F 7, - US $	35, - F 8, - US $

La souscription doit être envoyée à la :
Société Française de Microscopie Electronique
Ecole Normale Supérieure — Laboratoire de Botanique
24, rue Lhomond — Paris 5e.

Le paiement peut être fait :

par chèque bancaire, ou par virement postal (C.C.P. Paris 10 797-33), établi **au nom de la Société Française de Microscopie Electronique.**
Tous ces prix sont nets de toute remise.

UNIV. LEIDEN BIBL.

J. Microscopie (1967), **6**, 201-228

SYNTHÈSE ET TRANSFERT DES PROTÉINES CELLULAIRES DANS LES NEURONES GANGLIONNAIRES ÉTUDE RADIOAUTOGRAPHIQUE QUANTITATIVE EN MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE

Bernard DROZ
Département de Biologie, Centre d'Etudes Nucléaires, Saclay

Le concept de «flux axonal» a été établi par Weiss sur la base d'expériences dans lesquelles le matériel axoplasmique s'accumule en amont de la constriction ou de la section d'un nerf (Weiss, 1960; Lubinska, 1964). En microscopie ordinaire, les radioautographies réalisées après injection d'acides aminés tritiés ont apporté une preuve directe de l'existence d'un flux axonal de protéines dans des neurones *intacts* (Droz et Leblond, 1963). En effet, la synthèse des protéines est localisée dans le corps des cellules nerveuses (Cohn et coll., 1954; Leblond et coll., 1957), mais non dans l'axone (Schultze et coll., 1959; Droz et Leblond, 1963). Or, parmi les protéines néoformées, les unes, appelées « sédentaires », restent confinées dans le corps cellulaire tandis que les autres, appelées « migratrices », s'écoulent continuellement dans l'axone dont elles parcourent la longueur (Droz et Leblond, 1963; Utakoji et Hsu, 1965; Droz, 1965; Edström, 1966). Cependant, sur des radioautographies conventionnelles, on ne peut pas déceler les organites cellulaires qui synthétisent ou transfèrent les protéines dans les neurones; nous avons donc décidé d'utiliser la radioautographie combinée à la microscopie électronique pour identifier les étapes initiales du flux axonal et préciser les ultrastructures dont il assure le renouvellement.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

ADMINISTRATION DU PRÉCURSEUR (Tableau I)

Dans quatre séries, des rats s'alimentant et buvant *ad libitum* ont reçu une injection unique d'acides aminés marqués par le tritium soit par voie intrapéritonéale (exp. I), soit par voie intraveineuse (exp. II, III et IV). Les précurseurs utilisés ont été respectivement la L-leucine-4,5 ^{3}H (exp. I, II et III) et la DL-lysine-4,5 ^{3}H (exp. IV). Une expérience complémentaire (exp. V) a été effectuée sur des sangsues injectées avec de la L-leucine-4,5 ^{3}H.

Les injections intraveineuses ont été pratiquées, chez des rats anesthésiés à l'éther, par introduction d'un cathéter de polyéthylène dans la veine jugulaire externe. Les animaux ont été sacrifiés par décapitation. Dans les expériences II, III et IV, la radioactivité de la fraction acido-soluble du plasma a été déterminée à chaque temps de prélèvement. 15 µl de plasma ont été ajoutés à 10 ml d'acide trichloracétique à 5 pour cent afin de précipiter les protéines. Après centrifugation et lavage dans l'acide trichloracétique à 5 pour cent, 0,2 ml de surnageant ont été mélangés à 14,8 ml de liquide scintillant. La radioactivité a été mesurée dans un compteur à scintillation Packard Tricarb, après correction du « quenching » par utilisation d'un standard interne. Dans nos résultats, la radioactivité acido-soluble du plasma est exprimée en pourcentage de la dose injectée (Figures 1, 2 et 3).

RADIOAUTOGRAPHIE QUANTITATIVE

La chaîne ganglionnaire spinale a été fixée *in situ* par perfusion de glutaraldéhyde à 2 pour cent dans le canal rachidien. Après 30 minutes, les ganglions ont été prélevés, rincés pendant 1 heure 30 dans trois bains successifs de tampon phosphate à pH 7,4 et postfixés 1 heure dans le tétraoxyde d'osmium à 2 pour cent *. Après déshydratation dans l'éthanol et inclusion dans l'épon, des rubans de coupes de couleur homogène (or) ont été obtenus à l'aide d'un ultrotome LKB et déposés sur une lame porte-objet recouverte au préalable d'une membrane de celloïdine (Granboulan, 1965). Les coupes ont été contrastées à l'acétate d'uranyle, puis carbonées (Salpeter et Bachmann, 1965). Les radioauto-

* Le foie de ces animaux a fait l'objet d'une étude séparée (20).

TABLEAU I

Dénomination de l'expérience	Précurseur marqué		Animaux utilisés				Intervalles de temps entre l'injection et le prélèvement
	Acide aminé	Activité spécifique	Espèce	Poids	Voie d'injection	Dose injectée par animal	
I	L-leucine-4,5^{3}H	5 000 mCi/mM	rats	37 ± 1 g	intrapéritonéale	2 mCi	10, 30, 90 min et 6 h.
II	L-leucine-4,5^{3}H	5 000 mCi/mM	rats	37 ± 1 g	intraveineuse	2 mCi	2, 5, 10 et 20 min.
III	L-leucine-4,5^{3}H	5 000 mCi/mM	rats	250 ± 5 g	intraveineuse	12,5 mCi	2, 10, 30 min, 2 et 6 h.
IV	DL-lysine-4,5^{3}H	4 130 mCi/mM	rats	37 ± 1 g	intraveineuse	5 mCi	2, 10, 30 min et 2 h.
V	L-leucine-4,5^{3}H	5 000 mCi/mM	sangsues		intracoelomique	0,3 mCi	10 min, 1, 6 et 13 jours

TABLEAU II

Surface occupée par les différentes structures cytoplasmiques dans les sections de périkaryon des neurones ganglionnaires spinaux de type A_1
(exprimé en pourcentage)

	Corps de Nissl	Appareil de Golgi	Mitochondries	Neuroplasme	Lysosomes
Rats en croissance (37 g) ...	44,6 ± 1,1	3,0 ± 0,3	9,4 ± 0,3	42,6 ± 1,0	0,4 ± 0,05
Rats adultes (250 g)	44,6 ± 1,7	3,6 ± 0,2	10,8 ± 1,1	39,7 ± 1,5	1,3 ± 0,5

graphies ont été réalisées en trempant les lames dans l'émulsion Ilford L4 diluée au 1/5 dans l'eau distillée. Après deux mois d'exposition dans des boîtes étanches, contenant du P_2O_5 comme déshydratant, les radioautographies de chaque série ont été développées simultanément pendant 4 minutes dans le Microdol X à 18 °C, puis fixées pendant 5 minutes dans le thiosulfate à 30 pour cent. Après lavage, les membranes de celloïdine portant les radioautographies ont été décollées des lames porte-objet et transférées sur des grilles. Les membranes ont été amincies par dissolution dans l'acétate d'isoamyle pendant 3 minutes. Les radioautographies ont été examinées et photographiées avec un Elmiskop I Siemens.

Pour des expositions de faible intensité, Nadler (1953) a montré que le nombre de grains d'argent développés dans l'émulsion radioautographique est proportionnel à la quantité de radiations émises. Par conséquent, la concentration relative de la radioactivité dans les organites cellulaires peut être exprimée en nombre de grains d'argent rapportés à la surface de section de l'organite. La réalisation pratique de radioautographies utilisables pour une estimation quantitative implique un certain nombre d'exigences techniques :

1 — l'épaisseur des coupes doit être homogène et comparable (Williams et Meek, 1966), d'où la nécessité de réaliser des coupes de superficie réduite à l'aide d'un ultrotome automatique,

2 — les conditions de coulage, d'exposition et de développement des émulsions doivent être identiques pour toutes les radioautographies d'une même série (Granboulan, 1965).

En respectant ces conditions, on obtient des mesures reproductibles de la concentration de la radioactivité avec un écart-type inférieur à 10 pour cent (Droz et Bergeron, 1966).

Toutes les cellules ganglionnaires spinales du type A_1 (Andres, 1961) dont la section passe par le noyau, ont été systématiquement photographiées à un grossissement uniforme de 4 000 fois. Sur des

---

FIGURES 1, 2 et 3. Concentration relative de la radioactivité dans la fraction acido-soluble du plasma après nijection intraveineuse de L-leucine-4,5^{3}H (exp. II et III) ou de DL-lysine-4,5^{3}H (exp. IV) à des rats.

Le pourcentage de radioactivité dans la fraction acido-soluble du plasma :

$$\frac{100 \times \text{concentration de la radioactivité plasmatique} \times \text{volume du plasma}}{\text{Dose totale de radioactivité injectée}}$$

a été calculé en admettant que le volume du plasma est respectivement de 1,5 et 7,5 ml pour des rats pesant 37 et 250 g.

La majorité de la radioactivité injectée disparaît du plasma en 2 minutes. Noter que la chute est plus rapide après injection de L-leucine-^{3}H qu'après injection de DL-lysine-^{3}H, par suite de la persistance probable de l'isomère D dans le plasma.

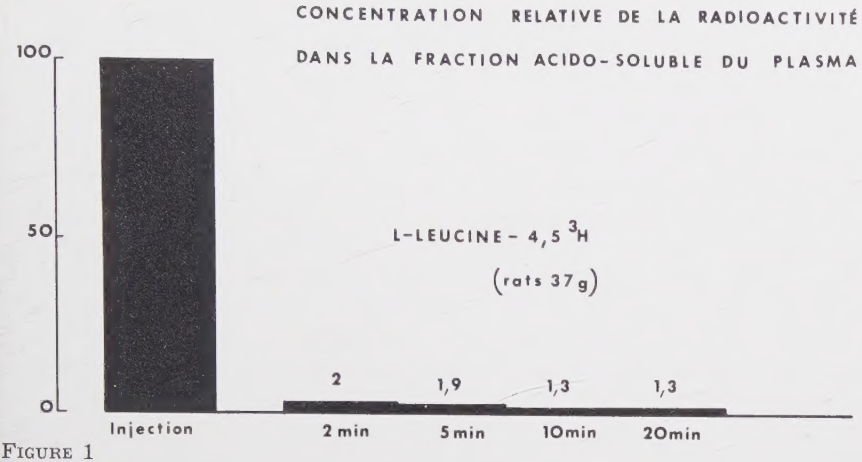


FIGURE 1

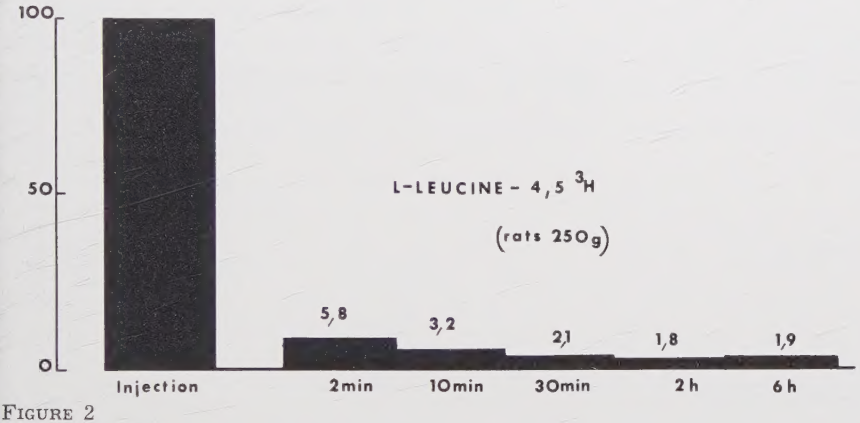


FIGURE 2

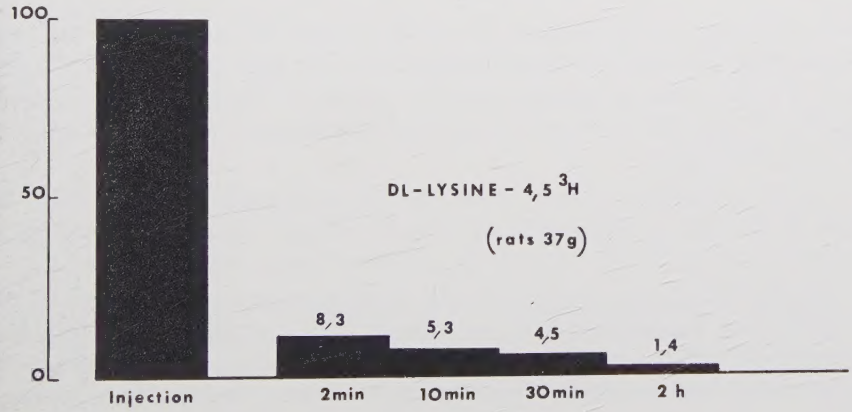


FIGURE 3

agrandissements 18 × 24 cm, les contours des divers organites ont été découpés et leur surface déterminée par pesée (tableau II). Les grains d'argent présents en totalité ou en majorité sur un organite sont comptés pour un grain. Si un grain est à cheval sur deux structures, on compte un demi grain pour chacune.

Le pouvoir de résolution de l'émulsion Ilford L4 a été calculé par Ross et Benditt (1965) en appliquant la méthode de Salpeter et Bachmann (1965). Quand on considère un grain d'argent développé, la source radioactive qui lui a donné naissance devrait se trouver à l'intérieur d'un cercle ayant un rayon maximum de 0,26 μ à partir du centre du grain. Or, à l'intérieur de ce cercle, la source radioactive a environ 70 % de chances d'être comprise à l'intérieur d'un cercle de 0,1 μ de rayon (Caro, 1962; Fromme et Zessack, 1966). En conséquence, la plupart des structures cellulaires ont des dimensions suffisantes pour y identifier la présence d'une source radioactive. En rapportant le nombre de grains d'argent à la surface des diverses structures contenues dans chaque cellule examinée, on obtient ainsi la concentration de la radioactivité dans les organites cellulaires à chaque temps de l'expérience.

RÉSULTATS

1. *RADIOACTIVITÉ PLASMATIQUE ACIDO-SOLUBLE* (exp. II, III et IV)

Après injection intraveineuse de L-leucine-4,5 ^{3}H (exp. II et III) la radioactivité plasmatique acido-soluble décroît très rapidement (Figures 1, 2 et 3) : elle ne représente plus que 2 à 8 pour cent de la dose injectée à 2 minutes et, par la suite, elle se maintient en plateau autour de 1 à 2 pour cent.

Après injection intraveineuse de DL-lysine-4,5 ^{3}H (exp. IV), la chute de la radioactivité acido-soluble du plasma est plus lente et plus progressive (Figure 3), sans doute par persistance de l'isomère D.

On en déduit que, après injection intraveineuse de DL-lysine-4,5 ^{3}H et surtout de L-leucine-4,5 ^{3}H, la grande majorité de la dose injectée correspond à un « signal » radioactif très bref, d'une durée inférieure à 2 minutes, tandis qu'une infime quantité de traceur persiste plusieurs heures dans le plasma.

2. *LES CELLULES GANGLIONNAIRES SPINALES*
(exp. I, II, III et IV)

La population des neurones ganglionnaires spinaux comprend plusieurs types cellulaires. Afin d'étudier quantitativement la cinétique des protéines dans un matériel homogène, nous avons sélectionné les neurones de type A_1 qui représentent environ 37 % de la population (Andres, 1961). Ces neurones ont un corps cellulaire de grande taille (40-70 µ). Leur noyau présente une chromatine fine et dispersée et un nucléole volumineux. Dans le périkaryon, les corps de Nissl sont séparés les uns des autres par des plages de neuroplasme contenant de nombreux neurofilaments et neurotubules parmi lesquels sont épars des ribosomes libres. Les corps de Nissl sont constitués par des citernes ergastoplasmiques parallèles et aplaties; entre ces citernes, de nombreux ribosomes libres sont groupés en rosette (Pl. I, fig. *a* et *b*). L'appareil de Golgi, qui forme un réseau autour du noyau, est composé de piles de saccules aplatis ou dilatés en vacuoles et de vésicules. Dans la concavité des arcs formés par les saccules, on trouve de nombreuses vésicules « tapissées » par un matériel dense (« coated vesicles ») et du réticulum endo-

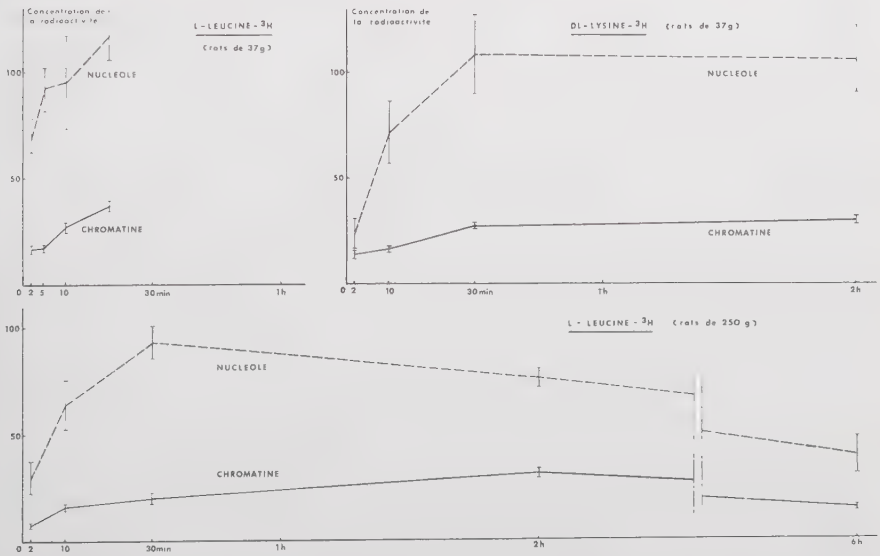


FIGURE 4. Evolution de la concentration de la radioactivité dans le nucléole et la chromatine de neurones ganglionnaires spinaux après injection intraveineuse de L-leucine-4,5^{3}H (exp. II et III) ou de DL-lysine-4,5^{3}H (exp. IV) à des rats.

On remarque que l'accroissement de la radioactivité est plus intense et plus précoce dans le nucléole que dans la chromatine.

plasmique lisse. Des corps opaques aux électrons, vraisemblablement des lysosomes, y sont fréquemment associés (Pl. II). Les mitochondries sont dispersées dans tout le périkaryon. L'axone prend naissance sur le périkaryon par un cône d'émergence qui contient des neurofilaments, des neurotubules, des mitochondries et des vésicules de réticulum endoplasmique lisse; excepté de rares ribosomes libres, il est dépourvu de corps de Nissl. Le glomérule, ou portion initiale de l'axone, présente un trajet sinueux et dépourvu de myéline. Par la suite, l'axone, exempt de corps de Nissl et de ribosomes, acquiert sa gaine de myéline (Pl. III et IV).

A. Le noyau

Deux minutes après l'injection, la réaction radioautographique apparaît d'emblée sur la chromatine et le nucléole (Pl. I, fig. *b*). L'accroissement de la radioactivité est plus rapide et plus intense dans le nucléole, surtout dans sa portion fibrillaire (Pl. V, fig. *a*), que dans la chromatine (Figure 4). Vers 1 heure 30, on observe fréquemment, sur des coupes tangentielles de la membrane nucléaire ,des grains d'argent en relation avec les pores nucléaires (Pl. V, fig. *b*).

B. Le périkaryon

a. *Les corps de Nissl*

A 2 minutes, la radioactivité est déjà élevée dans les corps de Nissl (Pl. I, fig. *a* et *b;* Tableaux IV et V) : elle atteint son maximum autour de 5 minutes, puis décroît lentement avec le temps (Figures 5 et 6).

b. *L'appareil de Golgi*

A 2 et 5 minutes, seuls quelques rares appareils de Golgi sont marqués à leur périphérie où des vésicules à parois lisses sont situées entre les saccules et les corps de Nissl. Par contre, entre 10 et 30 minutes, la radioactivité s'accumule dans l'appareil de Golgi où elle est deux fois plus concentrée que dans les corps de Nissl (Figures 5 et 6). A 10 mi-

---

Figures 5 et 6. Evolution de la concentration de la radioactivité dans différents constituants du périkaryon de rats de 37 g (Figure 5) et de 250 g (Figure 6) après injection intraveineuse de L-leucine-4,5^{3}H (exp. II et III).

L'ergastoplasme des corps de Nissl présente un premier pic de radioactivité. Le marquage dans le neuroplasme est déjà élevé à 10 minutes, tandis que l'appareil de Golgi présente un pic plus tardif.

Noter que pour des doses injectées comparables (54 et 50 µCi par gramme de poids corporel pour les rats pesant respectivement 37 g et 250 g), l'incorporation du traceur est plus intense chez les animaux en croissance que chez les animaux adultes.

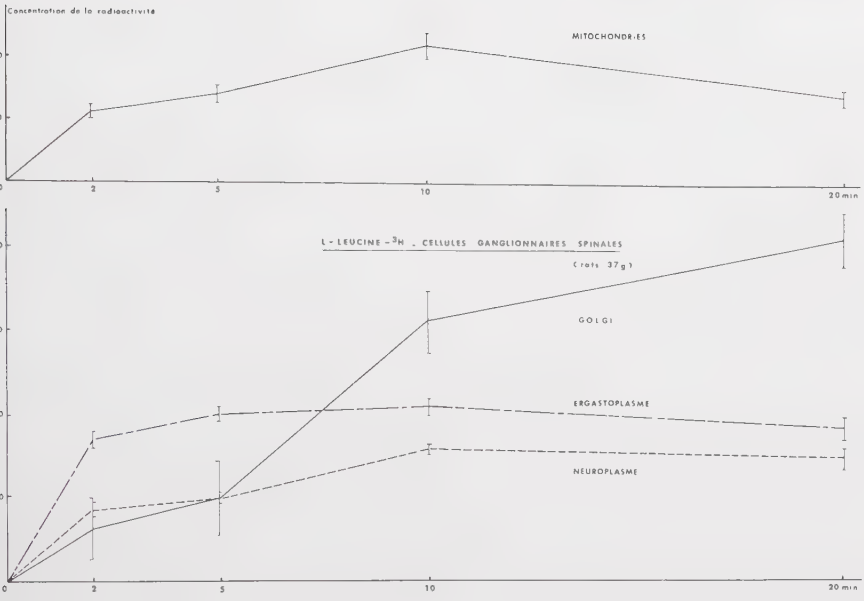


FIGURE 5

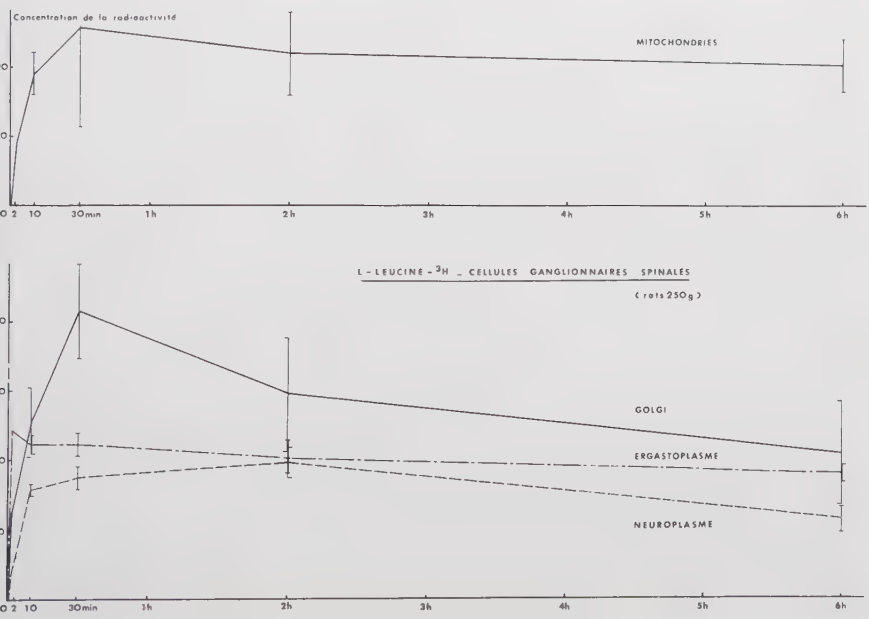


FIGURE 6

nutes, les grains d'argent sont distribués sur les vésicules lisses périphériques et surtout les saccules (Pl. II, fig. *a*). Vers 20-30 minutes, les grains d'argent persistent sur les saccules et occupent aussi la région des vésicules « tapissées » et du reticulum endoplasmique lisse (Pl. II, fig. *b* et *c;* Tableau III). Avec le temps, la radioactivité diminue dans l'appareil de Golgi (Figures 5 et 6; Tableaux IV et V), tandis que des vésicules marquées se dispersent dans le périkaryon (Pl. II, figure *d*), souvent à proximité de la membrane cellulaire. Entre 2 et 6 heures, on note la présence de lysosomes marqués (Pl. II, fig. *e*).

c. *Le neuroplasme*

La réaction radioautographique, d'abord discrète à 2 et 5 minutes, s'intensifie vers 10 minutes, puis décline après 2 heures (Figures 5 et 6).

d. *Les mitochondries*

Dès 2 minutes, les mitochondries sont le siège d'une réaction radioautographique nette qui atteint un maximum entre 10 et 30 minutes; par la suite, la radioactivité se maintient sensiblement en plateau.

C. L'axone

a. *Le cône d'émergence et le glomérule*

Dans les premières minutes qui suivent l'injection, le cône d'émergence de l'axone est faiblement marqué alors que le glomérule est exempt de grains d'argent (Pl. III, fig. *a*). Par la suite, la radioactivité envahit le cône d'émergence, la portion proximale du glomérule (Pl. III, fig. *b* et Pl. IV, fig. *a*) puis sa portion distale (Pl. IV, fig. *b*).

b. *L'axone myélinisé*

Si l'on excepte la présence de quelques grains d'argent dont la fréquence n'excède pas celle du voile de fond, tous les axones observés dans les 30 minutes qui suivent l'injection sont exempts de réaction. Par contre, au bout de 2 à 6 heures, un nombre limité de sections d'axone deviennent radioactives, dans leur portion proche du corps cellulaire (Pl. IV, fig. *b*) mais non dans leur portion plus distale constituant les racines postérieures de la moëlle.

Sur les sections d'axone marquées, les grains d'argent se distribuent essentiellement sur l'axoplasme riche en neurofilaments et en neurotubules ainsi que sur la membrane axolemmale. On note aussi la présence de quelques grains sur des vésicules de reticulum endoplasmique lisse et des mitochondries (Pl. IV et Pl. V, fig. *c*).

3. *Les axones des cellules ganglionnaires de sangsue* (exp. V)

Puisque la dispersion des neurofilaments et des neurotubules dans l'axoplasme des fibres nerveuses de rats ne permet pas de déterminer s'ils sont ou non la source de la radioactivité détectée dans les axones, nous nous sommes adressés aux fibres nerveuses de la chaîne ganglionnaire de sangsue. Les axones de sangsue contiennent des neurotubules, aussi bien dans leurs portions distales que dans leurs portions initiales (Couteaux, 1956). Ces neurotubules sont dispersés dans l'axoplasme, mais les neurofilaments, dont l'identification comme organites distincts des neurotubules n'a été faite, chez la sangsue, que plus tardivement, sont normalement groupés en faisceaux (Gray et Guillery, 1963; Coggeshall et Fawcett, 1964). Dans les portions initiales de l'axone, les neurofilaments sont d'abord épars en petits faisceaux au sein des neurotubules (Pl. VI, fig. *a*). Dans les portions distales de l'axone (Pl. VI, fig. *b* et *e*), les neurofilaments se groupent en un faisceau unique et serré formant une grosse neurofibrille axiale (Gray et Guillery, 1963; Coggeshall et Fawcett, 1964).

Dix minutes après l'injection, une faible réaction radioautographique est visible sur les corps cellulaires des neurones ganglionnaires. Après un jour, les cellules ganglionnaires et les portions initiales de l'axone sont le siège d'une réaction radioautographique franche; par contre, les portions distales de l'axone sont exemptes de réaction (Pl. VI, fig. *a* et *b*). 6 et 13 jours plus tard, les grains d'argent envahissent des régions axonales de plus en plus distales et s'accumulent en particulier sur les grosses neurofibrilles (Pl. VI, fig. *c* et *e*). Dans d'autres régions, la réaction semble associée à la présence de neurotubules axoplasmiques (Pl. VI, fig. *d*).

4. *Les cellules satellites et schwanniennes* (exp. I, II, III et IV)

On note la présence de grains d'argent sur l'ergastoplasme et les noyaux des cellules satellites et schwanniennes dès 2 minutes; ce marquage reste plus discret chez les rats adultes que chez les rats en croissance.

DISCUSSION

1. *Détection radioautographique des protéines néoformées*

L'utilisation d'acides aminés porteurs d'un atome de tritium rend possible la détection des sites de synthèse et des mouvements intracellulaires des protéines nouvellement élaborées à partir de ces précurseurs marqués. Cependant, l'étude cinétique des protéines cellulaires exige qu'un certain nombre de conditions soient remplies :

A. La quantité de précurseur injectée doit être suffisamment petite pour ne pas perturber le métabolisme normal

Roberts et Zomzely (1965) ont en effet montré que l'injection massive de leucine augmentait le taux de renouvellement de certaines protéines dans le tissu nerveux. Les quantités de L-leucine-4,5 ^{3}H et de DL-lysine-4,5 ^{3}H injectées dans nos expériences correspondent respectivement à 1,3 et 4,4 µg par gramme de poids corporel. Puisque, chez le rat, le plasma sanguin contient respectivement 20 et 70 µg/ml de leucine et de lysine (Shefner et Bergeim, 1954), on en déduit que les acides aminés plasmatiques ont été maintenus à un taux physiologique. Par conséquent, chaque acide aminé traceur, en se mélangeant à son homologue non marqué, devrait donner une représentation exacte du comportement de la population des acides aminés non marqués, à chaque temps de l'expérience.

B. Le signal radioactif doit être bref pour étudier la séquence des événements intracellulaires

Après injection intrapéritonéale (exp. I), la radioactivité des acides aminés libres du plasma met plusieurs heures pour disparaître (Leblond et coll., 1957; Ross et Benditt, 1965). Au contraire, l'injection intraveineuse (exp. II, III et IV) d'acides aminés à haute activité spécifique, en particulier des isomères L, permet d'introduire dans le torrent circulatoire une quantité définie de radioactivité dont la plus grande part se distribue dans les organes en moins de 2 minutes. En utilisant cette voie d'injection, on réalise un signal radioactif dont la brièveté permet d'analyser la séquence des événements intracellulaires avec une résolution dans le temps supérieure à celle de la voie intrapéritonéale.

C. La réaction radioautographique doit être produite par les protéines néoformées

Après administration de leucine ou de lysine tritiée dans l'organisme, ces acides aminés pénètrent dans le compartiment intracellulaire où ils peuvent être utilisés pour la synthèse de protéines.

Afin de vérifier que le fixateur extrait les acides aminés libres, Bergeron et Droz (non publié) ont effectué le contrôle suivant. Des fragments de foie de rat ont été homogénéisés et maintenus à la température de 4 °C. Après y avoir ajouté et mélangé pendant 30 secondes une solution de L-leucine-4,5 ^{3}H à raison de 50 µCi/ml d'homogénat, les homogénats ont été soit fixés par la glutaraldéhyde ou le tétraoxyde d'osmium à 2 pour cent, soit précipités par l'acide trichloracétique à 5 pour cent. Après centrifugation et lavage, les précipités ont été dissous dans l'hyamine et leur radioactivité mesurée au compteur à scintillation liquide. La radioactivité détectée après traitement à l'acide trichloracétique était extrêmement faible; après traitement à la glutaraldéhyde ou au tétraoxyde d'osmium, la radioactivité était 20 à 30 fois plus élevée. Puisqu'à 4 °C la synthèse des protéines est inhibée, la radioactivité décelée correspond probablement à de la leucine tritiée retenue par des liaisons non peptidiques. Caro et Palade (1964) pensent que les quelques grains d'argent rencontrés occasionellement aux temps courts sur des fibres collagènes ou des hématies sont vraisemblablement produits par une adsorption de ce type. Etant donné que la radioactivité parasite, qui peut être retenue par la glutaraldéhyde (Ashley et Peters, 1966), est proportionnelle à la concentration en acide aminé marqué libre dans le tissu, cette cause d'artéfact doit disparaître rapidement dans les minutes qui suivent l'injection.

De plus, Bergeron et Droz ont vérifié si les protéines néoformées sont retenues au cours du traitement des tissus pour la microscopie électronique. Après injection intraveineuse de 2 mCi de L-leucine-4,5 ^{3}H à un rat de 40 g, le foie a été prélevé 5 minutes plus tard et divisé en deux portions. Dans ces conditions, on a constaté que le résidu protéique contenait 34 pour cent de la radioactivité après traitement direct par l'acide trichloracétique et 32 pour cent après fixation à la glutaraldéhyde et préparation du tissu pour la microscopie électronique. On en déduit que, dans les coupes destinées à la radioautographie, environ 94 pour cent des protéines néoformées sont préservées.

2. *Sites de synthèse des protéines neuronales*

Puisque les protéines nouvellement synthétisées à partir d'acides aminés radioactifs peuvent être détectées par la réaction radioautographique qu'elles produisent, les structures cellulaires qui deviennent radioactives aussitôt après l'injection doivent donc contenir des protéines récemment synthétisées ou même en cours de synthèse. En d'autres termes, les réactions radioautographiques précoces signalent les sites de synthèse des protéines.

Dans le noyau, la réaction observée à 2 minutes sur la chromatine et le nucléole les désigne tous deux comme des sites de synthèse protéique (Pl. I, fig. *b*). Des radioautographies de coupes à la paraffine pratiquées après injection de leucine-^{3}H indiquaient déjà que les protéines néoformées apparaissaient plutôt dans la chromatine que dans le nucléoplasme (Leblond et coll., 1963). Par contre, les capacités synthétiques du nucléole semblaient en partie masquées par l'autoabsorption des rayons β du tritium dans cet organite de forte densité (Maurer et Primbsch, 1964). Il n'en est pas de même pour les coupes fines en microscopie électronique (Sandborn, 1963), où le nucléole se présente comme le siège de la plus forte concentration en protéines néoformées dans le noyau (Figure 4 et Pl. V, fig. *a*).

Dans le *périkaryon,* les corps de Nissl présentent à la fois la plus forte concentration et la plus grande quantité de protéines néoformées à 2 et 5 minutes (Figures 5 et 6; Pl. I, fig. *a* et *b;* Tableaux IV et V). Vu le rôle capital des ribosomes dans la synthèse protéique (Chapeville et coll., 1965), il est intéressant de constater que les ribosomes, soit attachés aux membranes ergastoplasmiques, soit libres, y sont extrêmement denses. Il est d'ailleurs vraisemblable que la réaction observée dans le neuroplasme soit due à la présence de ribosomes disséminés parmi les neurofilaments et les neurotubules. En effet, l'axone émergent, dépourvu de ribosomes, est exempt de réaction aux temps initiaux. On en conclut que les ribosomes, en particulier ceux des corps de Nissl, sont le site essentiel de la synthèse des protéines dans le périkaryon.

Les mitochondries éparses dans le périkaryon sont aussi le siège d'une réaction radioautographique précoce indiquant l'élaboration de protéines (Droz et Bergeron, 1965). Cependant, vu le petit volume occupé par ces organites (Tableau II), cette synthèse protéique demeure discrète devant l'activité considérable des corps de Nissl (Tableaux IV et V).

Confrontons ces conclusions avec les données biochimiques. Après administration de lysine-^{14}C à des singes, Furst et coll. (1958) ont frac-

TABLEAU III

Répartition des grains d'argent sur les différentes régions de la zone de Golgi à des intervalles de temps successifs après injection intraveineuse de L-leucine-4,5^{3}H (exp. II)
(exprimé en nombre de grains pour 100 sections d'appareil de Golgi)

Temps après l'injection	Zone comprise entre les corps de Nissl et les saccules	Zone des saccules et des vacuoles	Zone des vésicules « tapissées » et du reticulum endoplasmique lisse
2 minutes	7	3	0
5 minutes	11	8	5
10 minutes	22	31	14
20 minutes	13	46	26

TABLEAU IV

Distribution des grains d'argent comptés sur le périkaryon des cellules ganglionnaires spinales de rats de 37 g (exp. II) après injection intraveineuse de L-leucine-4,5^{3}H
(exprimé en pourcentage) *

Intervalle de temps après l'injection	Corps de Nissl pour cent	Appareil de Golgi pour cent	Mitochondries pour cent	Neuroplasme pour cent	Nombre de grains comptés
2 minutes	58,8 ± 3,9	1,7 ± 0,9	8,6 ± 0,9	30,9 ± 2,4	2 449
5 minutes	60,3 ± 3,0	2,0 ± 0,9	9,0 ± 0,8	28,7 ± 1,7	2 961
10 minutes	48,8 ± 2,6	5,0 ± 0,8	10,7 ± 1,1	35,5 ± 1,6	3 833
20 minutes	48,0 ± 5,8	7,3 ± 1,1	7,9 ± 0,7	36,8 ± 3,4	3 369

* Les mesures portent sur trois ganglions spinaux.

tionné les protéines des différentes régions du système nerveux en protéines nucléaires, mitochondriales et microsomales. Le taux d'incorporation le plus élevé a été trouvé dans les protéines des microsomes, les ribosomes étant l'élément actif de cette synthèse (Acs et coll., 1961; Clouet et coll., 1966). Néanmoins, les protéines nucléaires et mitochondriales ont aussi incorporé la lysine-^{14}C mais à un degré moindre que les microsomes. Il convient de souligner que la complexité structurale du système nerveux et la diversité des catégories cellulaires présentes (neurones, névroglie, vaisseaux) rendent difficile la préparation de fractions homogènes, exemptes de contamination, alors que la radioautographie décèle sans équivoque la présence de traceur dans les structures neuronales.

3. *SORT DES PROTÉINES NÉOFORMÉES*

La synthèse des protéines marquées cesse d'être décelée dès que l'activité spécifique du précurseur dans le compartiment des acides aminés libres tombe à un niveau incompatible avec la détection radioautographique. Dans le tissu nerveux, on peut admettre que l'activité spécifique de la lysine et de la leucine libre chute de la moitié de sa valeur maximale approximativement entre 20 et 34 minutes après l'injection (Lajtha, 1964). Par conséquent, dans les premières minutes qui suivent l'injection, les protéines en cours de synthèse incorporent beaucoup plus de résidus d'acides aminés marqués dans leur chaîne peptidique qu'aux temps plus tardifs. Or à ce moment, les protéines radioactives élaborées aussitôt après l'injection ont la possibilité de quitter leurs sites de synthèse et de migrer dans d'autres structures. En pratique, il est parfois difficile de décider si une structure contient le traceur par suite d'une activité synthétique *in situ* ou d'un transfert rapide à partir d'un autre organite. Ce problème peut souvent être résolu en analysant la cinétique du traceur, c'est-à-dire en examinant l'évolution de la concentration de la radioactivité dans les organites cellulaires aux différents temps de l'expérience (Ross et Benditt, 1965; Droz, 1966).

Dans le noyau, le lent accroissement de la radioactivité dans la chromatine se poursuit plus tardivement que dans le nucléole. En l'absence d'éléments en faveur d'un renouvellement ralenti des acides aminés libres dans le compartiment nucléaire, ces résultats suggèrent que le noyau recevrait peut-être aussi, par transfert, des protéines synthétisées dans le cytoplasme, ainsi que Byers et coll. (1963) l'ont noté chez les amibes. La présence du traceur au niveau des pores nucléaires (Pl. V, fig. *b*) semble indiquer l'existence d'échanges nucléocytoplasmiques de protéines, sans toutefois en préciser la direction.

TABLEAU V

Distribution des grains d'argent comptés sur le périkaryon des cellules ganglionnaires spinales de rats de 250 g (exp. III) après injection intraveineuse de L-leucine-4,5^{3}H
(exprimé en pourcentage)

Intervalle de temps après l'injection	Corps de Nissl pour cent	Appareil de Golgi pour cent	Mitochondries pour cent	Neuroplasme pour cent	Nombre de grains comptés
2 minutes *	79,3	3,3	7,0	10,4	1 368
10 minutes	52,0 ± 3,7	4,8 ± 0,9	10,5 ± 2,0	32,7 ± 2,8	1 922
30 minutes	47,0 ± 3,8	7,1 ± 1,2	13,1 ± 2,6	32,8 ± 4,4	2 111
2 heures	44,5 ± 5,4	5,3 ± 1,5	11,7 ± 2,0	38,5 ± 4,5	2 026
6 heures	51,8 ** ± 4,1	4,9 ± 1,8	14,2 ± 2,9	29,1 ± 4,8	1 558

* Les mesures portent sur trois ganglions spinaux, sauf à 2 minutes où un seul ganglion a été examiné.
** L'augmentation tardive du pourcentage de radioactivité dans les corps de Nissl pourrait laisser croire qu'une deuxième vague de protéines a été synthétisée. En fait, les courbes de concentration de la radioactivité (figure 6) démontrent clairement que le marquage disparaît relativement plus lentement des corps de Nissl que d'autres structures.

TABLEAU VI

Concentration de la radioactivité dans l'ergastoplasme et l'appareil de Golgi des cellules ganglionnaires spinales (CGS) et des cellules hépatiques (CH) (exp. II)
(exprimé en nombre de grains d'argent pour 100 μ^2)

	2 minutes		5 minutes		10 minutes		20 minutes	
	CGS	CH	CGS	CH	CGS	CH	CGS	CH
Ergastoplasme ...	32,3 ± 2,0	34,8 ± 2,9	40,0 ± 1,7	33,9 ± 1,4	41,9 ± 2,0	27,9 ± 1,4	36,3 ± 2,4	14,8 ± 2,1
Appareil de Golgi.	13,5 ± 7,4	0	20,0 ± 9,2	12,9 ± 5,8	63,0 ± 8,5	143,3 ± 22,9	81,8 ± 9,1	214,2 ± 23,7

Dans le *périkaryon,* les corps de Nissl atteignent d'emblée leur radioactivité maximale. Après 5 minutes, les protéines marquées dans les corps de Nissl se maintiennent à une concentration élevée et disparaissent lentement. L'examen des courbes de concentration de la radioactivité montre formellement qu'une fraction importante des protéines élaborées par les corps de Nissl y persiste au moins 6 heures, alors qu'à ce moment il n'y a plus de précurseur libre marqué dans les ganglions spinaux (Appeltauer et Saa, 1966). En comparant, chez les mêmes animaux, le comportement de la radioactivité dans les cellules hépatiques (Droz, 1966), on constate que la plupart des protéines radioactives disparaissent rapidement de l'ergastoplasme (Tableau VI). On en déduit que, dans les neurones, une fraction des protéines synthétisées dans les corps de Nissl y reste confinée : ces protéines « sédentaires » assureraient probablement le remplacement des protéines de structure.

Seuls quelques appareils de Golgi sont faiblement marqués à 2 et 5 minutes, alors que l'activité spécifique du précurseur dans le compartiment cellulaire atteint probablement sa valeur maximale. Après ce temps de latence, la radioactivité s'accroît selon une courbe en S avant d'atteindre un maximum vers 20 à 30 minutes (Figures 5 et 6). Si nos connaissances sur la synthèse des protéines (Chapeville et coll., 1965) ne permettent pas d'expliquer raisonnablement la présence de protéines radioactives dans l'appareil de Golgi, d'où proviennent alors les protéines marquées dans le complexe golgien ? Pour répondre à cette question, les seuls résultats radioautographiques ne peuvent apporter une démonstration rigoureuse mais ils permettent d'avancer un certain nombre d'arguments en faveur d'une origine ergastoplasmique. En effet, les protéines radioactives s'accumulent dans l'appareil de Golgi au moment où la production de protéines marquées par les corps de Nissl s'infléchit, par suite de l'appauvrissement du compartiment intracellulaire en précurseur radioactif. De plus, grâce à l'utilisation d'un bref signal radioactif, on peut rechercher sur les préparations les structures golgiennes qui deviennent radioactives les premières. En d'autres termes, il s'agit de déceler les structures envahies par la première vague de protéines marquées et d'en suivre la progression. On constate que le traceur apparaît d'abord à la périphérie de la zone golgienne (2-10 minutes) où des vésicules lisses serviraient probablement au transport des protéines entre les corps de Nissl et les saccules golgiens (Pl. II, fig. *a*). Puis, entre 10 et 20 minutes, les protéines se rassemblent dans les saccules aplatis ou dilatés en vacuoles (Pl. II, fig. *b*). Vers 20 et 30 minutes, la radioactivité occupe la zone où sont massés le réticulum endoplasmique lisse et les vésicules « tapissées » (Pl. II, fig. *c*). Plus tard, un certain nombre de vésicules semblent fusionner et participer à la formation de corps multivésiculaires et peut-être de lysosomes (Pl. II,

fig. *e*). D'autres vésicules appartenant au réticulum endoplasmique lisse se dispersent dans le neuroplasme (Pl. II, fig. *d*). En conséquence, l'apparition tardive de la radioactivité dans le complexe golgien indique qu'une fraction des protéines synthétisées probablement dans les corps de Nissl migre dans l'appareil de Golgi et s'y accumule avant d'être distribuée dans le réticulum endoplasmique lisse ou les lysosomes.

Les mitochondries du périkaryon renferment des protéines néoformées dont la stabilité est assurée au moins pendant plusieurs heures (Figures 5 et 6). Un comportement analogue a été observé dans les mitochondries des cellules hépatiques et rénales (Droz et Bergeron, 1965; Droz, 1966). Les protéines synthétisées par les mitochondries seraient principalement des lipoprotéines membranaires (Roodyn, 1962). D'après Beattie et coll. (1966) et d'après Haldar et coll. (1966), les mitochondries recevraient aussi par transfert les chaînes peptidiques des protéines complexes dont elles seraient incapables de faire la synthèse, par exemple le cytochrome c.

Dans le neuroplasme, la multiplicité des éléments structuraux ne permet pas une analyse fine de la localisation des protéines radioactives. Afin de soustraire la part prise par les ribosomes, considérons le neuroplasme de l'axone ou axoplasme, qui en est dépourvu. L'absence de réaction dans les minutes qui suivent l'injection correspondrait à l'incapacité pour l'axone d'élaborer les protéines axoplasmiques (Droz et Leblond, 1963; Droz, 1965). Si l'on excepte les axones géants des fibres de Mauthner chez les poissons où Edström a observé la présence d'ARN (1964) et l'incorporation d'acides aminés marqués (1966), l'existence d'une synthèse de protéines axoplasmiques *in situ* n'a pas encore été démontrée chez les mammifères. En effet, lorsqu'après avoir inactivé l'acétylcholinestérase de nerfs périphériques du chat, Kœnig (1966) a constaté la réapparition d'une activité cholinestérasique dans les axones intacts ou sectionnés, il pouvait s'agir aussi bien de la synthèse *de novo* que du démasquage de l'activité enzymatique d'une protéine déjà formée. En fait, l'examen des radioautographies d'axones réalisées à des temps plus tardifs montre que les protéines radioactives envahissent d'abord le cône d'émergence (Pl. III, fig. *b*), puis le glomérule axonal (Pl. IV, fig. *a* et *b*) et finalement l'axone myélinisé (Pl. IV, fig. *b*; Pl. V, fig. *c*). Dans l'axone, la réaction radioautographique semble en partie associée à la membrane axolemmale, aux vésicules de reticulum endoplasmique lisse et aux mitochondries, tandis que la majorité des grains d'argent se distribue sur l'axoplasme. Les protéines marquées de l'axoplasme sont-elles libres ou liées aux neurofilaments ou aux neurotubules ? Lorsque les neurofilaments et les neurotubules sont agglutinés à la suite d'une fixation défectueuse, les grains d'argent s'amassent sur les paquets de neurofilaments et de neurotubules plutôt

que sur l'axoplasme (Droz, 1965). En mettant à profit les particularités anatomiques des axones de sangsue, on constate que, après plusieurs jours, le traceur s'accumule effectivement dans les neurofilaments (Pl. VI, fig. *c* et *e*) et se distribue aussi dans l'axoplasme en association étroite avec les neurotubules (Pl. VI, fig. *d*). En conclusion, parmi les protéines élaborées dans le périkaryon, une fraction passe dans l'axone, où elles semblent entrer dans la constitution des neurofilaments et des neurotubules axoplasmiques; une part plus réduite revient à l'axolemme, au reticulum endoplasmique lisse et aux mitochondries.

4. *PROTÉINES MIGRATRICES ET APPAREIL DE GOLGI*

Dans le schéma maintenant classique de la sécrétion des protéines (Leblond, 1965), l'appareil de Golgi semble avoir pour fonction essentielle d'accumuler et de concentrer les protéines néoformées par l'ergastoplasme. Après avoir été « emballées » dans le complexe golgien sous forme de grains de sécrétion, de vésicules ou de vacuoles, ces protéines nouvellement fabriquées sont destinées à l'exportation. Cette séquence a été observée par radioautographie dans toutes les cellules étudiées secrétant des protéines, à l'exception peut être des fibroblastes, où les résultats de Ross et Benditt (1965) suggèrent qu'une partie des protéines serait excrétée directement à partir des citernes ergastoplasmiques.

Dans le cas des neurones ganglionnaires spinaux, l'exportation de protéines hors du territoire cellulaire (Korr et coll., 1966), si elle existe, n'est pas encore démontrée. Cependant, les radioautographies conventionnelles ont apporté la preuve que des protéines « migratrices » élaborées dans le corps des cellules nerveuses sont continuellement transportées dans les prolongements axonaux (Droz et Leblond, 1963). Dans les ganglions spinaux, ces protéines migrent à la fois dans les nerfs périphériques vers les terminaisons sensitives et dans les racines vers la moëlle épinière (Droz, 1965; Appeltauer et Saa, 1966). Le problème se pose donc de déterminer si les protéines « migratrices » passent ou non par l'appareil de Golgi. Dans des cultures de ganglions spinaux mises en présence de divers acides aminés marqués, Bunge et Bunge (1963) ont montré que l'appareil de Golgi n'accumulait pas les protéines néoformées. Cependant, *in vivo* les radioautographies obtenues 30 min. après l'injection de DL-leucine-4,5^{3}H ont fourni un résultat opposé dans les trois types de neurones examinés : des protéines récemment synthétisées migrent et s'accumulent dans l'appareil de Golgi (Droz, 1965). Ces dernières conclusions ont été pleinement confirmées par les résultats de nos quatre séries d'expériences; en particulier, l'examen des courbes de radioactivité montre sans ambiguité que la plus forte

concentration est enregistrée dans l'appareil de Golgi (Figures 5 et 6). Toutefois, quand on compare les concentrations mesurées dans les structures des neurones ganglionnaires et des cellules hépatiques des mêmes animaux (Tableau VI), on constate que la concentration de la radioactivité est encore plus élevée dans l'appareil de Golgi des cellules hépatiques que dans celui des neurones. En effet, dans les cellules hépatiques, l'analyse des courbes de concentration est compatible avec une migration intragolgienne de la majorité des protéines néoformées, c'est-à-dire « exportables »; par contre, dans les neurones ganglionnaires spinaux, les résultats quantitatifs révèlent que seule une fraction des protéines néoformées peut passer par l'appareil de Golgi. Or, les protéines accumulées dans l'appareil de Golgi semblent subir des sorts très différents selon les organites auxquels elles sont destinées : les corps denses des lysosomes resteraient confinés dans le périkaryon, les vésicules « tapissées » gagneraient la périphérie et assureraient peut-être le renouvellement de la membrane neuronale, tandis que le réticulum endoplasmique lisse d'abord dispersé dans le neuroplasme migrerait dans l'axone. A cette hétérogénéité structurale correspondrait une hétérogénéité biochimique; d'après Novikoff et coll. (1964), dans les petits neurones ganglionnaires spinaux, les saccules golgiens de la face convexe contiendraient des nucléosidediphosphatases et des thiaminepyrophosphatases tandis que ceux de la face concave, le réticulum endoplasmique lisse et les vésicules « tapissées » seraient riches en phosphatase acide. Or, la faible activité phosphatasique acide que l'on rencontre occasionnellement dans les axones est toujours liée à des vésicules de réticulum endoplasmique lisse (Holtzman et Novikoff, 1965), provenant sans doute de l'appareil de Golgi. On peut donc présumer que l'appareil de Golgi assurerait la ségrégation des différentes protéines néoformées et leur redistribution dans les organites cellulaires divers.

Cependant, les vésicules de reticulum endoplasmique lisse ne représentent qu'une fraction minime des protéines marquées dans l'axone; la plus grosse part est en effet constituée par les neurofilaments et les neurotubules de l'axoplasme (Droz, 1965). D'après Tennyson (1965), les neurotubules seraient formés *de novo* dans les neuroblastes au sein de la centrosphère, comme les fibres du fuseau mitotique (Mangan et coll., 1965); par la suite, au cours de la croissance, ils se répliqueraient sans intervention de la centrosphère. En effet, l'examen des courbes de radioactivité n'apporte pas d'argument en faveur d'une étape intragolgienne au cours de l'élaboration du neuroplasme riche en filaments et en tubules (Figures 5 et 6). Au contraire, l'examen de régions éloignées de tout appareil de Golgi comme la zone périphérique du périkaryon ganglionnaire ou des dendrites d'autres neurones (cellules de

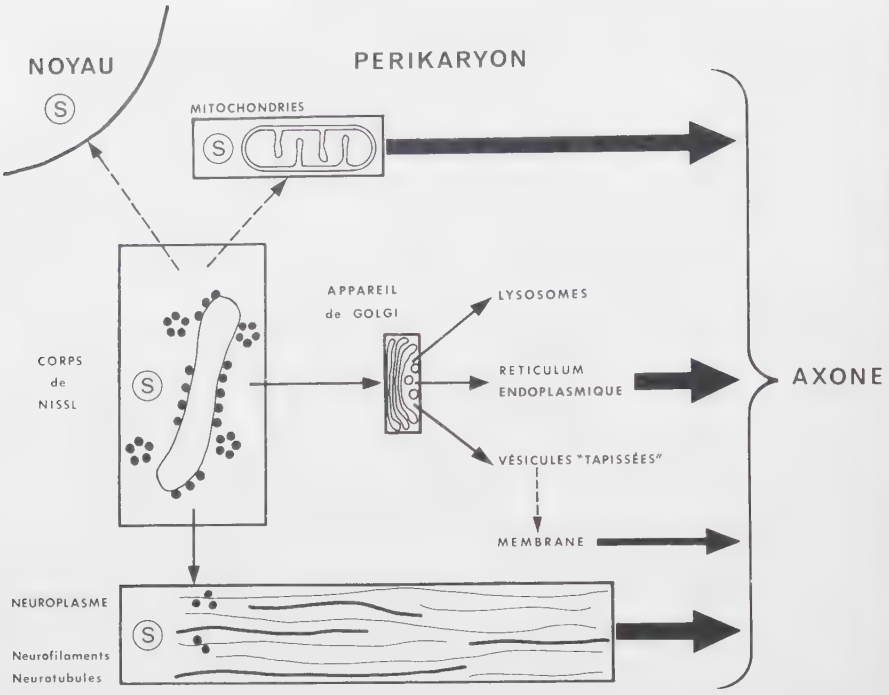


FIGURE 7. Schéma proposé pour le sort des protéines élaborées dans le périkaryon des neurones ganglionnaires spinaux.

Pour chaque structure cellulaire, la surface du rectangle est proportionnelle à leur superficie respective.

Dans les neurones ganglionnaires, la synthèse de protéines (S) a lieu essentiellement dans les corps de Nissl et, plus accessoirement, dans les mitochondries et le noyau (nucléole et chromatine).

Les protéines produites par les corps de Nissl peuvent subir des sorts variés :

A. Des protéines peuvent séjourner dans les corps de Nissl (protéines sédentaires).
B. Des protéines néoformées se détacheraient des ribosomes de l'ergastoplasme des corps de Nissl et passeraient dans l'appareil de Golgi où elles s'accumuleraient. Ces protéines prendraient part, soit à la formation des lysosomes, soit des vésicules « tapissées », soit du reticulum endoplasmique lisse. Le reticulum endoplasmique lisse semble en partie se disperser dans le périkaryon et en partie migrer dans l'axone. Les vésicules « tapissées » pourraient participer peut-être au renouvellement de la membrane du neurone.
C. Des protéines provenant des ribosomes semblent passer directement dans le neuroplasme où elles serviraient à l'édification des neurofilaments et des neurotubules. Cette élaboration continue entraînerait un déplacement des neurofilaments et des neurotubules dans l'axone.
D. En plus des protéines synthétisées *in situ*, les mitochondries recevraient par transfert des protéines élaborées probablement dans les corps de Nissl. Par la suite, des mitochondries migreraient dans l'axone.
E. Outre les protéines synthétisées par le nucléole et la chromatine, des protéines s'échangeraient entre le cytoplasme et le noyau.

Purkinje du cervelet et cellules ganglionnaires végétatives) semble indiquer que les neurofilaments et les neurotubules seraient édifiés probablement par addition de sous-unités protéiques (Schmitt, 1962) élaborées par les ribosomes. De même, l'élaboration des protéines mitochondriales semble indépendante de l'appareil de Golgi.

En conséquence, le rôle de l'appareil de Golgi dans l'élaboration des protéines « migratrices » semble être restreint à la formation de reticulum endoplasmique lisse et peut-être de la membrane axolemmale. Ainsi les protéines migratrices qui envahissent l'axone (Figure 7) proviennent d'organites aussi différents que les ribosomes, les mitochondries ou le complexe golgien et elles n'ont en commun que leur voie finale d'acheminement : l'axone.

Remerciements

Nous désirons exprimer notre profonde reconnaissance aux Professeurs R. Couteaux, C.P. Leblond et R.W. Young, pour leurs précieux conseils ainsi qu'au Dr M. Bergeron qui a assuré les dosages de radioactivité plasmatique.

Nous remercions particulièrement Mesdames J. Boyenval, M. Lucarain et Monsieur C. Condon dont nous avons apprécié la collaboration technique.

RÉSUMÉ

L'objet de cette étude radioautographique quantitative en microscopie électronique est d'analyser l'élaboration, les déplacements intracellulaires et la destinée des protéines neuronales. Après injection intraveineuse de L-leucine-4,5^{3}H ou de DL-lysine-4,5^{3}H à des rats, la majorité du précurseur disparaît du plasma en 2 minutes. La concentration de la radioactivité a été déterminée dans les organites des cellules ganglionnaires spinales à divers intervalles de temps après l'injection. L'examen des courbes de radioactivité permet de distinguer entre synthèse *in situ* et transport de protéines. Le premier pic de radioactivité apparaît dans les corps de Nissl (5 min); d'autres pics sont décelés plus tardivement dans l'appareil de Golgi (20 - 30 min) et dans le neuroplasme (10 min - 2 h). Par la suite, le traceur passe du cône d'émergence de l'axone dans le glomérule (30 - 90 min) puis envahit progressivement l'axone myélinisé (2 - 6 h). Dans l'axone, le traceur se distribue principalement dans l'axoplasme riche en neurofilaments et en neurotubules, tandis que les autres constituants sont plus faiblement marqués. La présence de traceur dans les faisceaux de neurofilaments et les neurotubules a pu être confirmée dans une expérience chez la sangsue.

On en déduit que les protéines nouvellement synthétisées peuvent soit persister au moins plusieurs heures dans les corps de Nissl (protéines sédentaires), soit migrer rapidement dans l'axone (protéines migratrices). Les protéines migratrices qui contribuent à la formation des neurofilaments et des neurotubules ne passent

vraisemblablement pas par l'appareil de Golgi tandis que celles qui s'accumulent dans les structures golgiennes donneraient naissance à des vésicules de reticulum endoplasmique.

SUMMARY

The synthesis, intracellular migration and fate of protein in neurons were quantitatively investigated by electron microscope radioautography. After intravenous injection of L-leucine-4,5^{3}H or DL-lysine-4,5^{3}H in rats, most of the non-protein label disappeared from the plasma within 2 minutes. The concentration of the radioactivity was measured in the organelles of the spinal ganglionic cells at various time intervals after injection. Inspection of the resulting curves made it possible to disclose whether the label appeared by synthesis *in situ* or transport. The earliest peak of radioactivity appeared in the Nissl substance (5 min); other peaks were observed later in the Golgi complex (20 - 30 min) and in the neuroplasm (10 min - 2 h). Next, the label underwent a cellulifugal migration from the axon hillock to the glomerulus (30 - 90 min) and then to the myelinated axon (2 - 6 h). The radioactivity found in the axons was most concentrated in the axoplasm rich in neurofilaments and neurotubules. The other components of the axon account only for a minor part of the labeling. A confirmatory experiment in the leech showed that the bundles of neurofilaments and neurotubules were mainly responsible for the axoplasmic radioactivity.

It is concluded that the newly formed proteins either spend at least several hours in the Nissl substance (sedentary protein) or migrate rapidly toward the axon (migratory protein). Migratory protein which would contribute to the formation of the neurofilaments and neurotubules bypass probably the Golgi region whereas those which accumulate in the Golgi complex would give rise to smooth surfaced vesicles.

BIBLIOGRAPHIE

1. Acs G., Neidle A. et Waelsch H., 1961. Brain ribosomes and amino acid incorporation. *Biochem. Biophys. Acta*, **50**, 403-404.
2. Andres K.H., 1961. Untersuchungen über den Feinbau von Spinalganglia. *Z. Zellforsch*, **55**, 1-48.
3. Appeltauer G.S.L. et Saa E.E., 1966. Incorporation of C^{14}-lysine into spinal roots, spinal ganglia and peripheral nerves of the rat. *Exptl. Neurol* .,**14**, 484-495.
4. Ashley C.A. et Peters T. jr, 1966. Binding of free amino acids to protein in solution and in tissue slices as an artefact of glutaraldehyde fixation. *Fed. Proc.* (abstr.), **25**, 357.

5. Bunge R.P. et Bunge M.B., 1963. Electron microscopic autoradiographic studies of amino acid incorporation into cultured dorsal root ganglion neurons. *Anat. Rec.* (abstr.), **145,** 213.

6. Beattie D.S., Basford R.E. et Koritz S.B., 1966. Studies on the biosynthesis of mitochondrial protein components. *Biochem.*, **5,** 926-930.

7. Byers T.J., Platt D.B. et Goldstein L., 1963. The cytonucleoproteins of amoebae. II Some aspects of cytonucleoprotein behavior and synthesis. *J. Cell Biol.*, **19,** 467-475.

8. Caro L.G., 1962. High resolution autoradiography. — II The problem of resolution. *J. Cell Biol.*, **15,** 189-199.

9. Caro L.G. et Palade G.E., 1964. Protein synthesis, storage and discharge in the pancreatic exocrine cell; an autoradiographic study. *J. Cell Biol.*, **20,** 473-495.

10. Chapeville F., Haenni A.L. et Herve G., 1965. Quelques étapes fondamentales de la biosynthèse des protéines. *Oitavas jornadas bioquimimas latinas,* **8,** 3-31.

11. Clouet D.H., Ratner M. et Williams N., 1966. ^{14}C-leucine incorporation into brain ribosomes. *Biochem. Biophys. Acta,* **123,** 142-150.

12. Cohn P., Gaitonde M.K. et Richter D., 1954. The localisation of protein formation in the rat brain. *J. Physiol.* (abstr.), **126,** 7P.

13. Coggeshall R.E. et Fawcett D.W., 1964. The fine structure of the central nervous system of the leech, Hirudo medicinalis. *J. Neurophysiol.*, **27,** 229-289.

14. Couteaux R., 1956. Neurofilaments et neurofibrilles dans les fibres nerveuses de la sangsue. *Electron microscopy Proc. Stockholm Conference,* Sjöstrand F.S. et Rhodin J. ed., Acad. Press, New York, 188-189.

15. Droz B. et Leblond C.P., 1963. Axonal migration of proteins in the central nervous system and peripheral nerves as shown by radioautography. *J. Compar. Neurol.*, **121,** 325-346.

16. Droz B., 1965*a*. Fate of newly synthesized proteins in neurons. Dans " *The use of radioautography in investigating protein synthesis* ", Leblond C.P. et Warren K.B. ed., Acad. Press, New York, **4,** 159-175.

17. Droz B., 1965*b*. Accumulation de protéines nouvellement synthétisées dans l'appareil de Golgi du neurone; étude radioautographique en microscopie électronique. *C.R. Acad. Sc.*, **260,** 320-322.

18. Droz B. et Bergeron M., 1965. Détection radioautographique de protéines nouvellement synthétisées à partir de L-leucine-^{3}H dans

les mitochondries du foie et du rein chez le rat. *C.R. Acad. Sc.*, **261**, 2757-2760.

19. Droz B. et Bergeron M., 1966. Quantitative electron microscopic radioautography : conditions and application to the kinetics of mitochondrial proteins. *J. Histochem. Cytochem.* (abstr.), **14**, 755.
20. Droz B., 1966. Sites de synthèse et migration des protéines dans les cellules hépatiques du rat; étude radioautographique en microscopie électronique. *C.R. Acad. Sc.*, **262**, 1654-1656.
21. Edström A., 1964. The ribonucleic acid in the Mauthner neuron of the goldfish. *J. Neurochem.*, **11**, 309-314.
22. Edström A., 1966. Amino acid incorporation in isolated Mauthner nerve fibre components. *J. Neurochem.*, **13**, 315-321.
23. Fromme H.G. et Zessack U., 1966. Electron microscopic autoradiography in a magnetic field. *J. Histochem. Cytochem.* (abstr.), **14**, 753.
24. Furst S., Lajtha A. et Waelsch H., 1958. Amino acid and protein metabolism - III Incorporation of lysine into the proteins of various brain areas and their cellular fractions. *J. Neurochem.*, **2**, 216-225.
25. Granboulan P., 1965. Comparison of emulsions and techniques in electron microscope radioautography. Dans " *The use of radioautography in investigating protein synthesis* ", Leblond C.P. et Warren K.B. ed., Acad. Press, New York, **4**, 43-63.
26. Gray E.G. et Guillery R.W., 1963. An electron microscopical study of the ventral nerve cord of the leech. *Z. Zellforsch.*, **60**, 826-849.
27. Haldar D., Freeman K. et Work T.S., 1966. Biogenesis of mitochondria. *Nature*, **211**, 9-12.
28. Holtzman B. et Novikoff A.B., 1965. Lysosomes in the rat sciatic nerve following crush. *J. Cell Biol.*, **27**, 651-669.
29. Koenig E., 1965. Synthetic mechanisms in the axon. I. - Local axonal synthesis of acetylcholinesterase. *J. Neurochem.*, **12**, 343-355.
30. Korr I.M., Wilkinson N.P. et Chornock F.N., 1966. Axonal delivery of neuroplasmic components to muscle cells. *Fed. Proc.* (abstr.), **25**, 570.
31. Lajtha A., 1964. Protein metabolism of the nervous system. *Intern. Rev. Neurobiol.*, **6**, 1-98.
32. Leblond C.P., Everett N.B. et Simmons B., 1957. Sites of protein synthesis as shown by radioautography after administration of S^{35} labeled methionine. *Am. J. Anat.*, **101**, 225-256.

33. Leblond C.P., Pinheiro P., Droz B., Amano M. et Warshawsky H., 1963. Sites of RNA and protein synthesis in the cell as shown by radioautography. *Canad. Cancer Conf.*, **5**, 19-36.

34. Leblond C.P., 1965. What radioautography has added to protein lore. Dans " *The use of radioautography in investigating protein synthesis* ", Leblond C.P. et Warren K.B. ed., Acad. Press, New York, **4**, 321-339.

35. Lubinska L., 1964. Axoplasmic streaming in regenerating and in normal nerve fibers. Dans " *Progress in brain research* ", Singer M. et Schade J.P. ed., Elsevier, Amsterdam, **13**, 1-66.

36. Mangan J., Miki-Noumura T. et Gross P.R., 1965. Protein synthesis and the mitotic apparatus. *Science*, **147**, 1575-1578.

37. Maurer W. et Primbsch E., 1964. Grösse der β Selbstabsorption bei der ^{3}H Autoradiographie. *Exptl. Cell Res.*, **33**, 8-18.

38. Nadler N.J., 1953. The quantitative estimation of radioactive isotopes by radioautography. *Am. J. Roentgenol.*, **70**, 814-823.

39. Novikoff A.B., Quintana N., Villaverde H. et Forschirm R., 1964. The Golgi zone of neurons in rat spinal ganglia. *J. Cell Biol.* (abstr.), **23**, 68 A.

40. Roberts S. et Zomzely C.E., 1965. Regulation of protein synthesis in the brain. Dans " *Protides of the biological fluids* ", Peeters H. ed., Elsevier, Amsterdam, **13**, 91-102.

41. Roodyn D.B., 1962. Protein synthesis in mitochondria. III. - The controlled disruption and subfractionation of mitochondria labelled in vitro with radioactive valine. *Biochem. J.*, **85**, 177-189.

42. Ross R. et Benditt E.P., 1965. Wound healing and collagen formation. V. - Quantitative electron microscope radioautographic observations of proline-H^{3} utilisation by fibroblasts. *J. Cell Biol.*, **27**, 83-106.

43. Salpeter M.M. et Bachmann L., 1965. Assessment of technical steps in electron microscope radioautography. Dans " *The use of radioautography in investigating protein synthesis* ", Leblond C.P. et Warren K.B. ed., Acad. Press, New York, **4**, 23-41.

44. Sandborn E., 1963. Amino acid incorporation in the neurons of the semilunar ganglion of the rat. *Anat. Rec.* (abstr.), **145**, 280.

45. Schmitt F.O., 1962. Psychophysics considered at the molecular and submolecular levels. Dans " *Horizons in biochemistry* ", Kasha M. et Pullman B. ed., Acad. Press, New York, 437-456.

46. Schultze B., Oehlert W. et Maurer W., 1959. Autoradiographische Untersuchung zum Mechanismus der Eiweissneubildung in Ganglienzellen. *Beitr. pathol. Anat.*, **120,** 58-84.

47. Shefner A.L. et Bergeim O., 1954. Effects of adrenocorticotrophic hormone (ACTH) upon free amino acid levels of plasma and tissues. *Arch. Biochem. Biophys.*, **49,** 327-334.

48. Tennyson V.M., 1965. Electron microscopic study in the developing neuroblast of the dorsal root ganglion of the rabbit embryo. *J. Compar. Neurol.*, **124,** 267-318.

49. Utakoji T. et Hsu T.C., 1965. Nucleic acid and protein synthesis of isolated cells from chick embryonic spinal ganglia in culture. *J. Exptl. Zool.*, **158,** 181-201.

50. Weiss P., 1960. The concept of perpetual neuronal growth and proximo-distal substance convection. Dans " *Regional Neurochemistry* ", Kety S.S. et Elkes J. ed., Pergamon Press, London, **4,** 220-242.

51. Williams M.A. et Meek G.A., 1966. Studies on thickness variation in ultrathin sections for electron microscopy. *J. Roy. Microsc. Soc.*, **85,** 337-352.

Manuscrit reçu le 17 novembre 1966.

Planche I

Radioautographies de cellules ganglionnaires spinales de rat 2 minutes après l'injection intraveineuse de L-leucine-4,5^{3}H.

Fig. a. (exp. III). Les grains d'argent de la réaction radioautographique sont distribués sur les corps de Nissl *(Ns)*. Dans le neuroplasme *(np)*, on remarque un feutrage de neurofilaments *(nf)*, des neurotubules *(nt)* et quelques ribosomes libres *(ri)*. × 37 000.

Fig. b. (exp. II). Dès 2 minutes, la réaction prédomine dans le périkaryon sur les corps de Nissl *(Ns)* et reste discrète sur le neuroplasme *(np)*. La plupart des appareils de Golgi *(Go)* sont exempts de grains d'argent. Dans le noyau, noter la réaction sur la chromatine *(chr)* et sur le nucléole *(nu)*. Le glomérule *(glo)* et l'axone myélinisé *(ax)* ne sont pas marqués à ce temps. Dans l'ensemble, les cellules de Schwann *(Sch)* ou les cellules satellites *(st)* sont faiblement marquées. × 14 000.

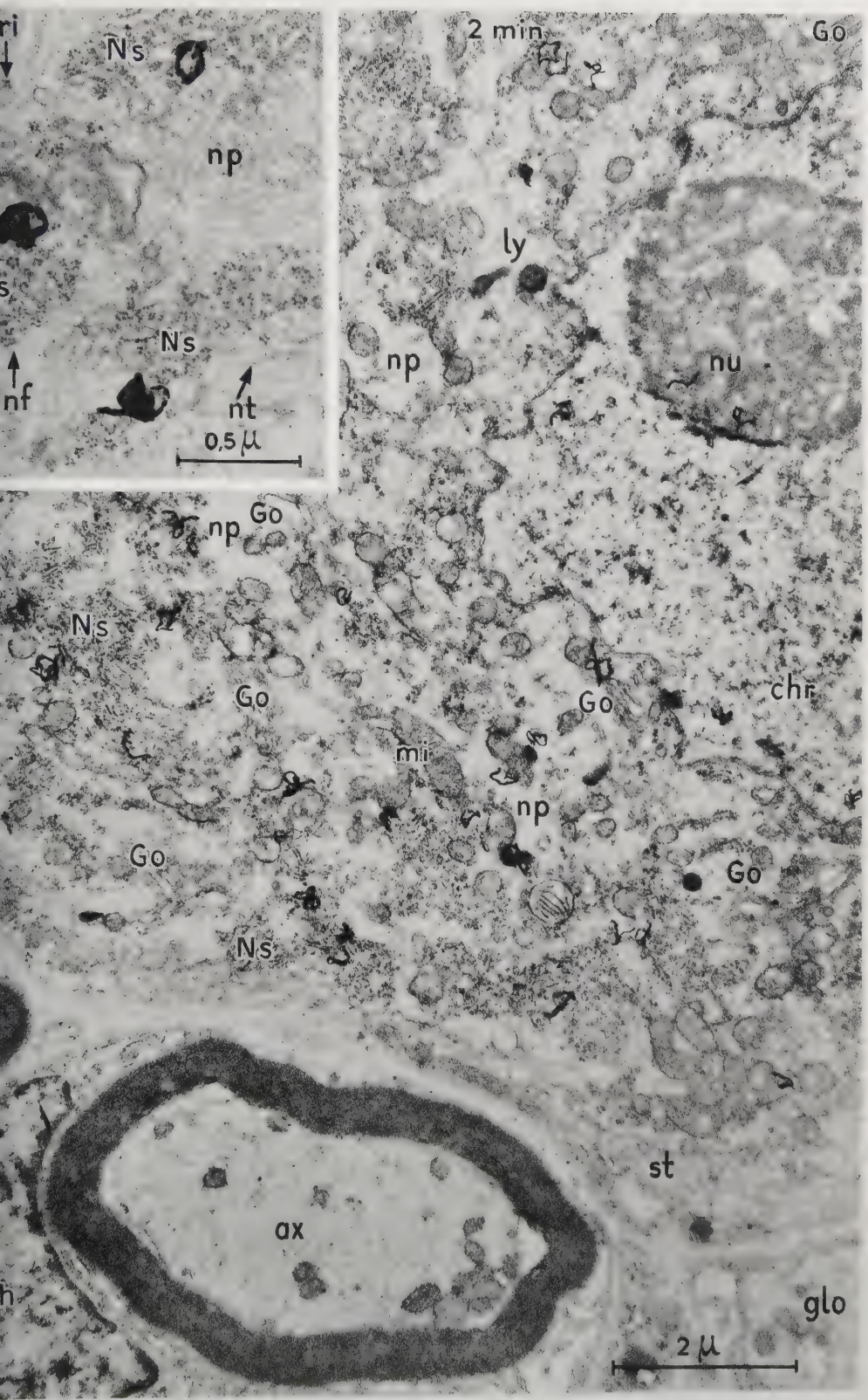

ri
Ns
np
s
Ns
nf
nt
0.5 μ
2 min
Go
ly
np
nu
np
Go
Ns
Go
Go
chr
mi
np
Go
Go
Ns
st
ax
h
glo
2 μ

Planche II.

Radioautographies de cellules ganglionnaires spinales de rat après injection intraveineuse de L-leucine-4,5^{3}H ou de DL-lysine-4,5^{3}H.

Fig. a. — (Exp. III). A 10 minutes, la réaction a lieu sur les vacuoles (*va*) et les saccules (*s*) de l'appareil de Golgi (*Go*). Les flèches indiquent des vésicules dont les membranes sont partiellement recouvertes de ribosomes; les grains d'argent situés au voisinage de l'appareil de Golgi semblent en relation avec ces structures; × 40 000.

Fig. b. — (Exp. II). A 20 minutes, les grains d'argent sont situés sur les saccules golgiens (*s*) et sur les régions contenant des vésicules lisses (*rel*) et « tapissées » (*vet*). A droite, noter la présence d'un grain d'argent sur une mitochondrie (*mi*); × 35 000.

Fig. c. — (Exp. IV). A 30 minutes, les grains d'argent sont localisés à la fois aux extrémités des saccules golgiens (*s*) et sur des groupes de vésicules (*ve*) lisses ou « tapissées ». Noter la présence de corps denses, probablement des lysosomes (*ly*); × 30 000.

Fig. d. — (Exp. IV). A 2 heures, l'appareil de Golgi (*Go*) est vidé de sa radioactivité. Noter la réaction sur des éléments du réticulum endoplasmique lisse (*rel*); × 28 000.

Fig. e. — (Exp. III). A 6 heures, des lysosomes sont marqués; × 36 000.

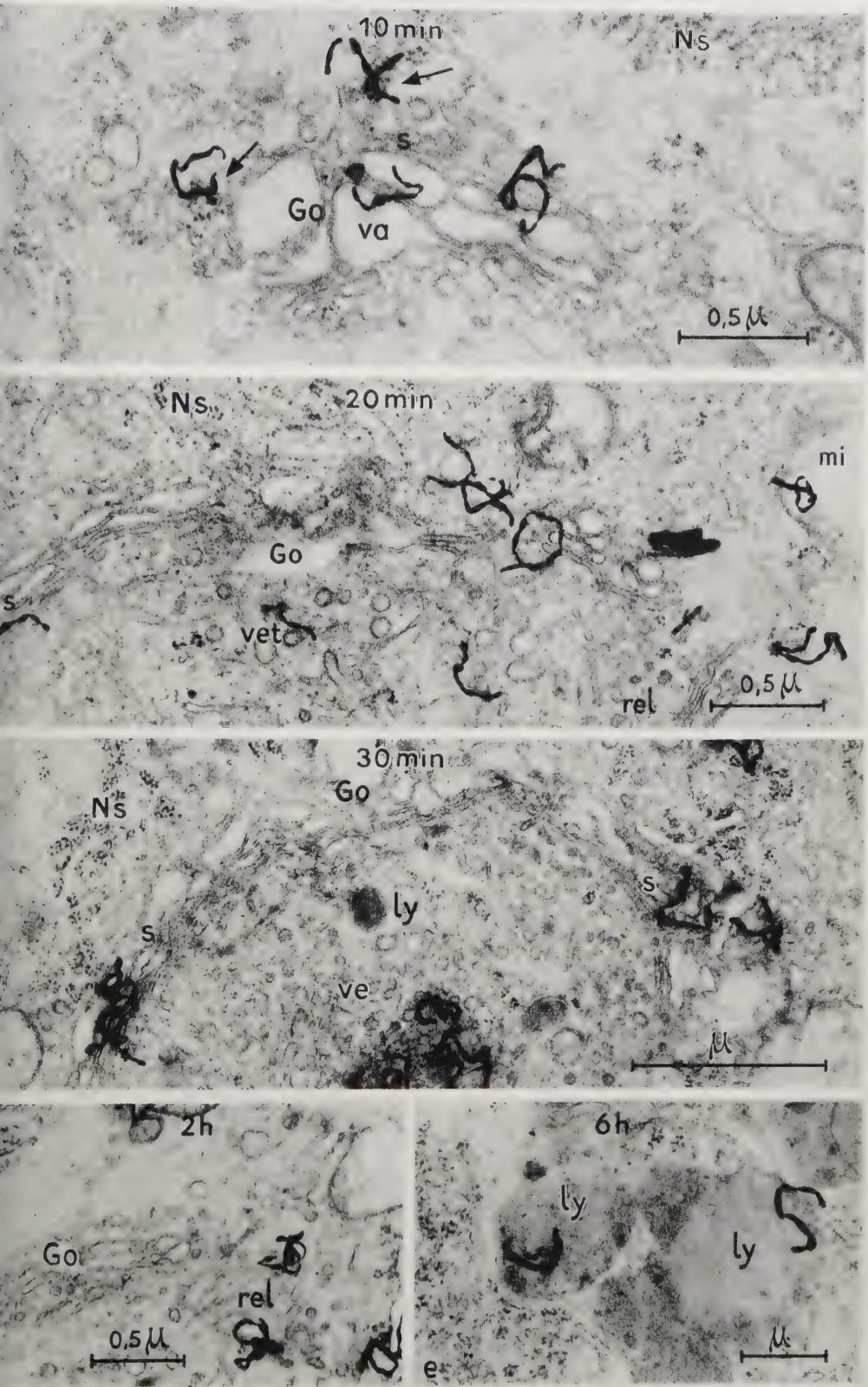
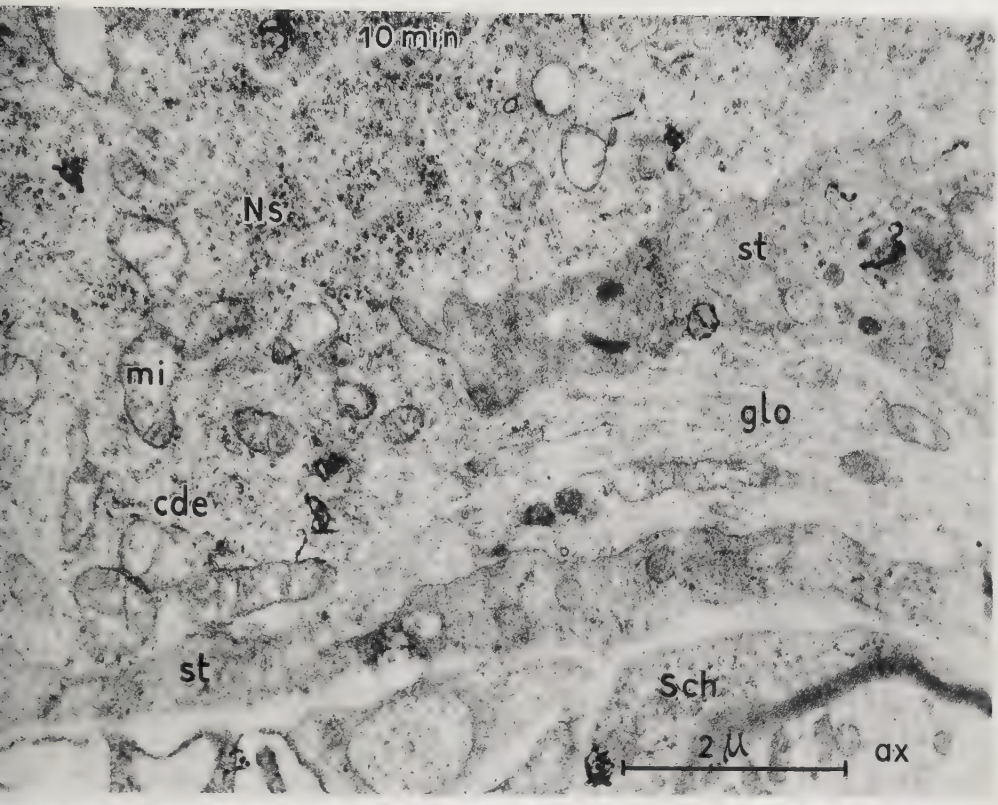

10 min
Ns
s
Go
va
0,5 µ
Ns
20 min
mi
Go
s
vet
rel
0,5 µ
30 min
Go
Ns
ly
s
s
ve
µ
2h
Go
rel
0,5 µ
6h
ly
ly
e
µ

Planche III.

Radioautographies du cône d'émergence de l'axone de cellules ganglionnaires spinales de rat après injection intrapéritonéale de L-leucine-4,5^{3}H (exp. I).

Fig. a. — A 10 minutes, la réaction se produit sur les corps de Nissl (*Ns*) du périkaryon et sur des ribosomes du cône d'émergence (*cde*). Le glomérule (*glo*) est exempt de grain d'argent ainsi que l'axone (*ax*). Noter la présence d'une radioactivité discrète dans les cellules satellites (*st*) et les cellules de Schwann (*Sch*); × 15 000.

Fig. b. — A 90 minutes, de nombreux grains d'argent sont maintenant trouvés sur le glomérule (*glo*). On remarque une mitochondrie marquée (*mi*); × 15 000.


10 min
Ns
st
mi
glo
cde
st
Sch
2 μ
ax

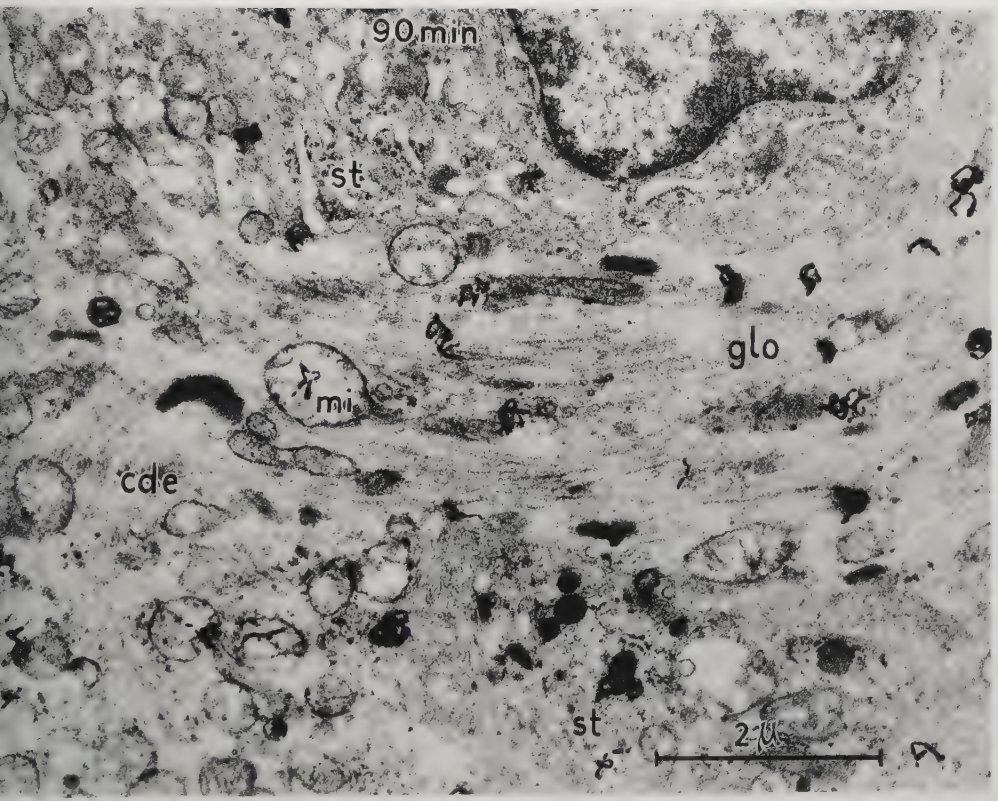

90 min
st
glo
mi
cde
st
2 μ

Planche IV.

Radioautographies de segments successifs de l'axone des cellules ganglionnaires spinales du rat après injection de DL-lysine-4,5^{3}H ou de L-leucine-4,5^{3}H.

Fig. a. — (Exp. IV). 30 minutes après injection de DL-lysine-4,5^{3}H, la réaction apparaît sur les régions *initiales* du glomérule (*glo*). La plupart des grains d'argent se distribuent sur l'axoplasme; noter la présence d'une vésicule (*ve*) et d'une mitochondrie (*mi*) marquées, *cmv*, corps multivésiculaire; × 14 000.

Fig. b. — (Exp. IV). 2 heures plus tard, la radioactivité envahit les régions *distales* du glomérule (*glo*) et passe dans le début de l'axone (*ax*) qui s'entoure d'une gaine de myéline (*my*); × 16 000.

Fig. c. — (Exp. I). 6 heures après l'injection intrapéritonéale de L-leucine-4,5^{3}H, la réaction radioautographique produite sur l'axone (*ax*) est localisée sur l'axoplasme, riche en neurofilaments et en neurotubules, les éléments du réticulum endoplasmique lisse (*rel*) et les mitochondries (*mi*). Cette fibre nerveuse pauvre en myéline correspond probablement à un axone de cellule ganglionnaire spinale du type B; × 21 000.

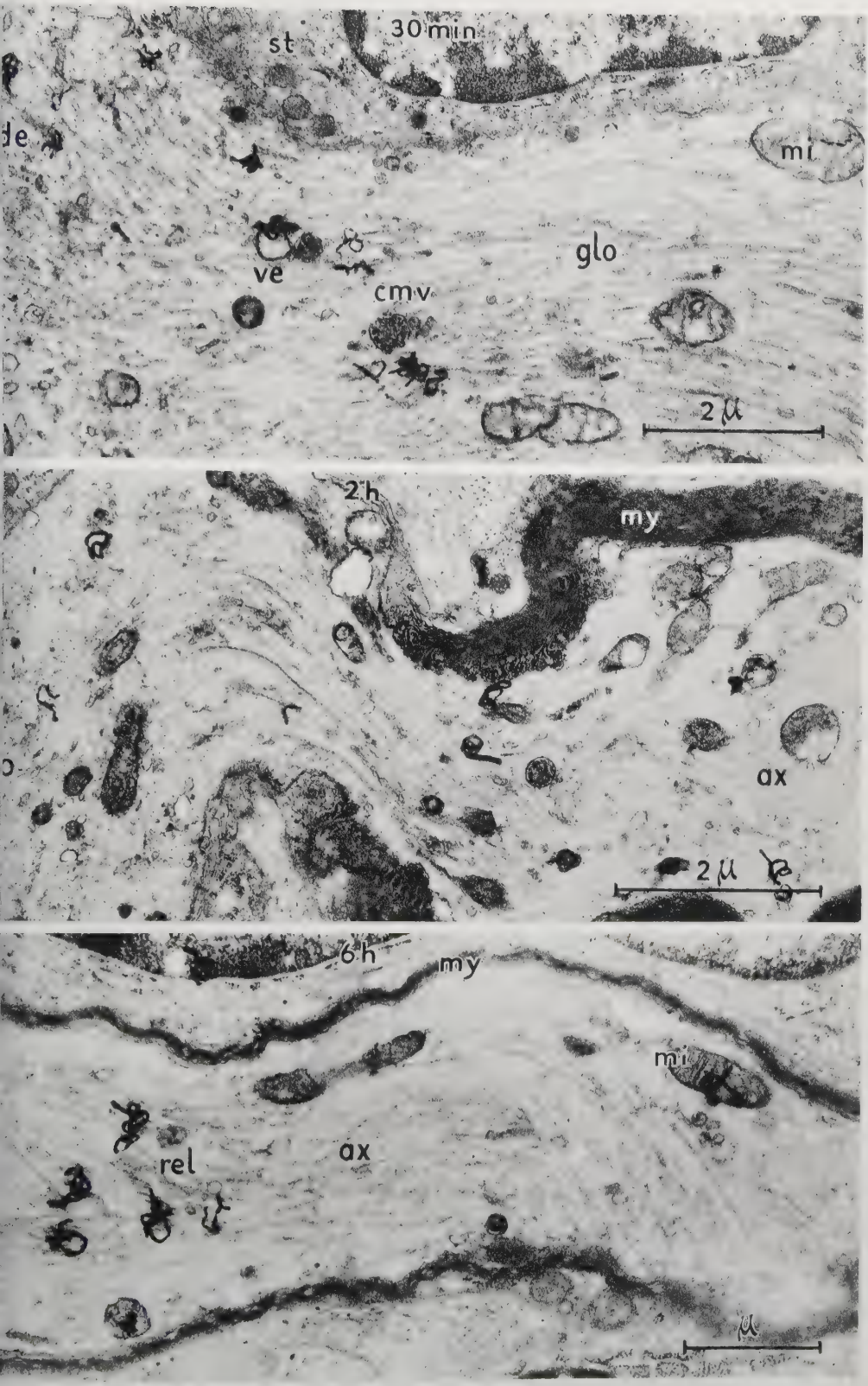

st
30 min
mi
glo
ve
cmv
2 µ
2 h
my
ax
2 µ
6 h
my
mi
rel
ax
µ

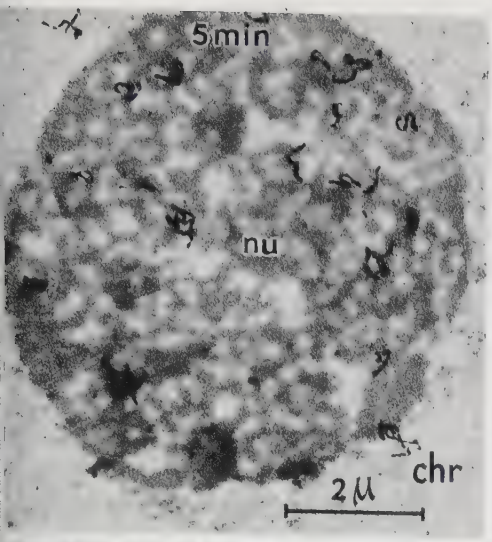
Planche V.

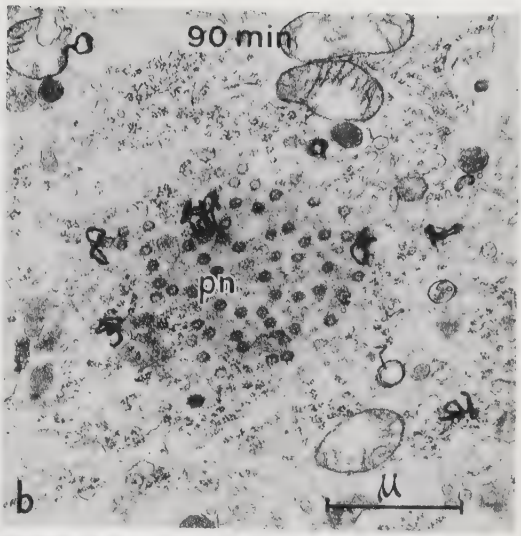
Radioautographies de cellules ganglionnaires spinales chez le rat après injection de L-leucine-4,5^{3}H.

Fig. a. — (Exp. II). 5 minutes après injection intraveineuse, les grains d'argent sont concentrés sur les portions denses du nucléole (*nu*), la réaction sur la chromatine (*chr*) est nettement moins intense; × 9 000.

Fig. b. — (Exp. I). Sur cette coupe tangentielle de membrane nucléaire, on note la présence de grains d'argent en relation avec les pores nucléaires (*pn*) 90 minutes après l'injection intrapéritonéale; × 18 000.

Fig. c. — (Exp. III). 6 heures après l'injection intraveineuse, un axone myélinisé (*ax*, *my*) provenant probablement d'une cellule ganglionnaire spinale de type A contient du matériel radioactif. Les grains d'argent sont répartis essentiellement sur l'axoplasme contenant de nombreux neurofilaments (*nf*) et neurotubules (*nt*). La flèche indique un grain d'argent en relation avec la membrane axolemmale (*axl*); × 25 000.


5 min
nu
chr
2 μ


90 min
pn
b
μ

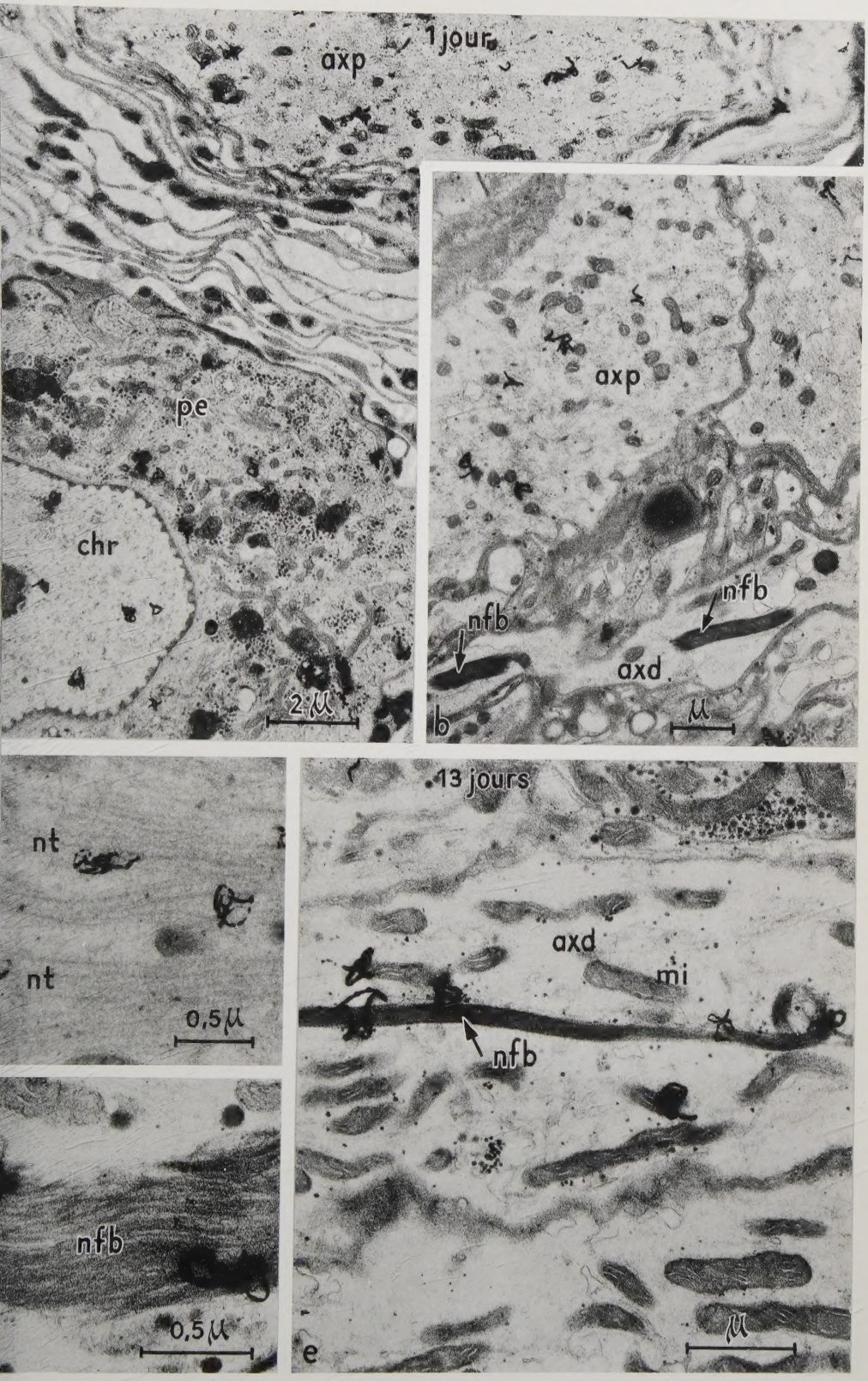
glo
6 h
Sch
my
ax
mi
nt
nf
axl
μ

Planche VI.

Radioautographies d'axones de sangsue *(Hirudo medicinalis)* après injection de L-leucine-4,5^{3}H (exp. V).

Fig. a et b. — Un jour après l'injection, la réaction radioautographique est présente sur les corps cellulaires des neurones (chromatine, *chr*, et périkaryon, *pe*) ainsi que sur les segments *proximaux* des axones (*axp*, *Fig. a*). Par contre, elle est absente des segments *distaux* des axones (*axd*, *Fig. b*) reconnaissables à leur volumineuse neurofibrille (*nfb*); *Fig. a* : × 7 000; *Fig. b* : × 10 000.

Fig. c, d et e. — 13 jours plus tard, les segments *distaux* des axones deviennent à leur tour radioactifs. Les grains d'argent se concentrent sur les neurofibrilles (*nfb*) et semblent s'associer aux neurotubules (*nt*) de l'axoplasme; *Fig. c* : × 24 000; *Fig. d* : × 34 000; *Fig. e* : × 17 000.


1 jour
axp
pe
chr
2 μ
axp
nfb
nfb
axd
b
μ
nt
nt
0,5 μ
13 jours
axd
mi
nfb
μ
e
nfb
0,5 μ

INSTRUCTIONS AUX AUTEURS

MANUSCRITS. Les manuscrits doivent être envoyés à la Société Française de Microscopie Electronique, 24, rue Lhomond, Paris (5e).

Bien que la langue officielle soit le *français*, le journal accepte des articles en *anglais* ou en *allemand*.

Les manuscrits doivent être dactylographiés en double interligne.
Les mémoires ne peuvent en général dépasser 20 pages imprimées, soit 50 000 caractères environ. Les lettres à l'éditeur : deux pages imprimées, soit 5 000 caractères.

ILLUSTRATIONS PHOTOGRAPHIQUES. Les photographies sont reproduites sur des planches hors texte par phototypie sur papier pelliculé; celles-ci sont placées à la fin de l'article; la justification des planches est de 140 × 210 mm. Elles sont numérotées en chiffres romains; si un planche comporte plusieurs micrographies, celles-ci sont désignées par les lettres : a, b, c, etc... à l'intérieur de chaque planche. Il est demandé aux auteurs de faire parvenir deux jeux des photographies : un jeu où les photographies sont assemblées et lettrées selon les désirs de l'auteur, un second jeu non monté et non lettré. Le montage des planches et le lettrage sont faits par les éditeurs, ceci afin de rendre plus homogène la présentation des documents. Le journal offre quatre planches hors texte gratuites par mémoire. Les lettres à l'éditeur ne comportent qu'une planche gratuite. Les planches supplémentaires sont aux frais de l'auteur au prix de 300 F chacune.

FIGURES AU TRAIT. Les figures et schémas au trait ainsi que leurs légendes sont reproduits dans le texte et leur place doit être indiquée sur le manuscrit. Elles sont numérotées en chiffres arabes.

BIBLIOGRAPHIE. Les références des auteurs cités dans le texte sont placées à la fin de l'article et disposées par ordre alphabétique. Elles peuvent alors être numérotées pour faciliter les renvois du texte à la bibliographie.

Le journal, le volume, la première et la dernière page ainsi que le titre de l'article doivent être indiqués.

La ponctuation doit être placée selon le modèle :

1. FAURÉ-FREMIET E., 1961. Le cytoplasme stomo-pharyngien des Ciliés cyrtophores *C.R. Ac. Sc.*, **253**, 357-362.
2. GIBBONS I.R. et GRIMSTONE A.V., 1960. On flagellar structure in certain flagellates *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **7**, 697-716.
3. WIESENBERGER E., 1958. Die Anwendung Mikrochemischer Nachweisverfahren in der Electronenmikroskopie. *Quatrième Congrès International de Microscopie Electronique*, Springer éd., Berlin. I, 769-779.

RÉSUMÉS. Il est demandé deux résumés : *un résumé en français et un autre en anglais* qui sont placés à la fin de l'article. Chacun de ces résumés ne doit pas dépasser une quinzaine de lignes soit 1 000 caractères environ. Il n'est pas demandé de résumé pour les lettres à l'éditeur.

TIRÉS A PART. En même temps que l'envoi de son manuscrit, il est demandé à l'auteur de préciser le nombre de tirés à part désiré. Ceux-ci lui sont facturés au prix coûtant. Pour des raisons techniques dues au procédé de reproduction par phototypie, le nombre de tirés à part ne peut être inférieur à 200. Au-delà de ce nombre les tirés à part sont fournis par multiple de 100.